

**DIE WIRKUNG NIEDERMOLEKULARER MILZ- UND SERUM-
EXTRAKTE AUF DAS WEISSE BLUTBILD VON NMRI-MÄUSEN
SOWIE AUF BLUTBILD UND LEUKAMISCHE PROLIFERATION
VON MÄUSEN MIT AKUTER LYMPHATISCHER LEUKAMIE**

Ferdinand Reithmeyr

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551922_0032

Aus dem Institut für Hämatologie
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung
Assoziation mit Euratom, München
(Komm. Leiter: Priv.Do. Dr. S. Thierfelder),
der I. Medizinischen Klinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegk)
und dem Lehrstuhl für Innere Medizin, spez. Hämatologie
(Komm. Vorstand: Prof. Dr. R. Marx)

DIE WIRKUNG NIEDERMOLEKULARER MILZ- UND SERUM-
EXTRAKTE AUF DAS WEISSE BLUTBILD VON NMRI-MÄUSEN
SOWIE AUF BLUTBILD UND LEUKÄMISCHE PROLIFERATION
VON MÄUSEN MIT AKUTER LYMPHATISCHER LEUKÄMIE

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians - Universität zu München
vorgelegt von

Ferdinand Reithmeyr
aus Augsburg
1974



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Marx

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Eder

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 12. 1974

Meinen Eltern in
Dankbarkeit gewidmet

Dem ehemaligen Leiter des Instituts für Hämatologie, Herrn Prof. Dr. med. W. STICH möchte ich für die Überlassung des Themas danken.

Für die Übernahme der Arbeit sei in besonderer Weise Herrn Prof. Dr. med. R. MARX gedankt.

Für die Möglichkeit und Unterstützung der Weiterführung der Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. med. H. EHRHART.

Mein aufrichtiger Dank für die unermüdliche und vorbildliche Hilfe bei der gesamten Durchführung der Arbeit gilt Herrn Dr. med. M. SCHMIDT.

Für die Unterstützung bei allen Laborarbeiten möchte ich den Damen des Labors, Frau IMML und Frau VOGEL danken.

Schließlich darf ich noch all denen danken, die mir durch manche Ratschläge und Diskussionen oder durch ihre technische Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit nicht unwesentlich geholfen haben.

GLIEDERUNG

	Seite
A	E I N L E I T U N G 1
A 1	Funktionen der (normalen, menschlichen) Milz 2
A 1.1	Zirkulation 2
A 1.2	Regulation 2
A 1.3	Abwehr 3
A 2	Humorale Wirkstoffe 4
A 2.1	Hinweise bei normaler Milztätigkeit 5
A 2.2	Hinweise bei Splenektomie 6
A 2.3	Hinweise bei Hypersplenismus 8
A 2.4	Hinweise bei Extraktanwendung 10
A 3	Begründung und Formulierung der eigenen Arbeit 12
B	M A T E R I A L U N D M E T H O D I K 14
	(Präparation und Versuche)
B 1	Herstellung von einfachen Extrakten 14
B 1.1	Einfacher Milzextrakt (ME) 14
B 1.2	Einfacher Serumextrakt (SE) 15
B 1.3	Gewaschene Erythrozyten 15
B 1.4	Zweite Dialyse 17
B 2	Herstellung von fraktionierten Extrakten 17
	(Säulenchromatographie)
B 2.1	Präparation 17
B 2.2	Analyse 17
B 3	Peptid- und pH-Messungen 20

	Seite
B 4 Tierversuche	23
B 4.1 Tiere	23
B 4.1.1 Intakte Mäuse	23
B 4.1.2 Mäuse mit akuter lymphatischer Leukämie	23
B 4.2 Haltung der Tiere	24
B 4.3 Einzeldosis und Injektion	24
B 4.4 Blutabnahme und Auswertung	24
B 5 Statistische Auswertung	25
C E R G E B N I S S E M I T N M R I - M Ä U S E N	27
C 1 Blutbild unbehandelter Tiere	27
C 2 Verhalten des Blutbildes nach einfachem Milz- und Serumextrakt	29
C 2.1 Verhalten der Leukozytenzahl	29
a) nach NaCl	
b) nach ME	
c) nach SE	
d) Vergleich	
C 2.2 Verhalten der Zahl der stabkernigen Granulozyten	33
a) nach NaCl	
b) nach ME	
c) nach SE	
d) Vergleich	
C 2.3 Verhalten der Zahl der segmentkernigen Granulozyten	36
a) nach NaCl	
b) nach ME	
c) nach SE	
d) Vergleich	

C 2.4	Verhalten des Kernverschiebungsindex	39
	a) nach NaCl	
	b) nach ME	
	c) nach SE	
	d) Vergleich	
C 2.5	Verhalten der Lymphozytenzahl	43
	a) nach NaCl	
	b) nach ME	
	c) nach SE	
	d) Vergleich	
C 2.6	Verhalten der Zahl der eosinophilen Granulozyten	46
C 2.7	Verhalten der Monozytenzahl	46
	a) nach NaCl	
	b) nach ME	
	c) nach SE	
	d) Vergleich	
C 3	Kurzzeitversuche	49
C 3.1	Fraktionierter ME und SE nach G - 25	49
C 3.1.1	Säulenlauf und Fraktionierung	49
C 3.1.2	Vergleich der Milz- und Serumfraktionen	53
C 3.2	ME nach G - 25 und G - 50	55
C 3.3	ME und SE nach G - 25 und 2 x G - 50, fraktioniert	57
C 3.3.1	Fraktionierung nach G - 50	57
C 3.3.2	Vergleich der Milz- und Serumfraktionen	57
C 3.3.3	Kernverschiebungsindex	61
C 3.4	Vergleich	64
C 4	Langzeitversuche	66

C 4.1	6-Tage-Versuch mit ME, Urbason und ACTH	66
C 4.2	Blutbild nach einmaliger und wiederholter Injektion von Milzextrakt	70
C 4.2.1	Verhalten der Leukozytenzahl	70
C 4.2.2	Verhalten der Granulozytenzahl	73
C 4.2.3	Verhalten des Kernverschiebungsindex	75
C 4.2.4	Verhalten der Lymphozytenzahl	77
C 4.2.5	Verhalten der Monozytenzahl	79
C 4.2.6	Vergleich der einmal mit den wiederholt behandelten Tieren	81
C 4.3	Blutbild nach einmaliger und wiederholter Injektion von Serumextrakt	82
C 4.3.1	Verhalten der Leukozytenzahl	82
C 4.3.2	Verhalten der Granulozytenzahl	84
C 4.3.3	Verhalten des Kernverschiebungsindex	86
C 4.3.4	Verhalten der Lymphozytenzahl	88
C 4.3.5	Verhalten der Monozytenzahl	90
C 4.3.6	Vergleich der einmal mit den wiederholt be- handelten Tieren	92
C 4.4	Vergleich der Milzextrakt- und Serumextrakt- wirkung bei einmaliger und wiederholter Injektion	92
D	ER G E B N I S S E M I T C B L - M Ä U S E N (LEUKÄMIEVERSUCHE)	94
D 1	Weißes Blutbild und Überlebensrate nach einmaliger und wiederholter ME-Injektion	94
D 1.1	Versuchsaufbau und zeitlicher Verlauf der Leukämie	94
D 1.2	Weißes Blutbild	96
D 1.2.1	Leukozytenzahl	96
D 1.2.2	Zahl der stabkernigen Granulozyten	99

D 1.2.3	Zahl der segmentkernigen Granulozyten	101
D 1.2.4	Lymphozytenzahl	103
D 1.2.5	Monozytenzahl	106
D 1.3	Vergleich der Ergebnisse bei den CBL-Mäusen mit denen bei den JMRI-Mäusen	111
D 1.4	Überlebensrate nach ME und nach 0,9% NaCl	111
D 1.5	Korrelation zwischen Blutbild und Überlebensrate	116
D 2	Weißes Blutbild und Überlebensrate nach ME, G - 25, fraktioniert	117
D 2.1	Fraktionierung	117
D 2.2	Weißes Blutbild	119
D 2.3	Überlebensrate	120
D 3	Überlebensrate nach SE, G - 25, fraktioniert	123
E	D I S K U S S I O N	126
E 1	der eigenen Ergebnisse	126
E 2	möglicher unspezifischer Ursachen	131
E 3	der Hinweise auf spezifische Ursachen	136
E 4	der chemischen Natur	138
E 5	der physiologischen Stimulation	138
E 6	möglicher Wirkungsmechanismen	139
F	Z U S A M M E N F A S S U N G	144
G	T A B E L L A R I S C H E R A N H A N G	147
H	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	179
I	L E B E N S L A U F	197

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Beziehung zwischen Milz und weißem Blutsystem: um zu sehen, in welchem Gesamtkomplex möglicher Milzwirkungen diese Beziehung sich befindet, sei an den Anfang eine Zusammenfassung wichtiger Funktionen der Milz gestellt (menschliche Erwachsenenmilz, z.T. ganz andere Verhältnisse bei embryonalen und kindlichen Milzen, vgl. HITTMAYER 74; SIEGENTHALER 122). Drei Funktionskreise (Zirkulation; Regulation; Abwehr) lassen sich der leichteren Übersicht wegen abgrenzen; die Übergänge sind aber fließend und Einzelvorgänge meist mit dem Ganzen koordiniert (HITTMAYER 74). Aufgeschlüsselt sind die Einzelfunktionen weiterhin in sicher nachgewiesene (s) und wahrscheinliche (w): zahlreiche Vorgänge müssen bis jetzt als bestenfalls wahrscheinlich charakterisiert werden, da bei der Milz 1. normales und pathologisches Verhalten oft schwer zu trennen ist (vgl. BLAUSTEIN 16; BURCKHARDT 21; GANONG 50) und 2. Tierversuche (wegen verschiedener Anatomie und Physiologie, vgl. v. HERRATH 71) nur ganz bedingt auf den Menschen übertragen werden können.

A 1 F u n k t i o n e n d e r (normalen, mensch-
lichen) M i l z

A 1.1 Zirkulation:

- Aktiver Einfluß auf die zirkulierende Blut-
menge (s)
- Blut-Reservoir-Funktion, vor allem Erythro-
zyten und Thrombozyten (s)
- Eliminierung fester Bestandteile aus den Ery-
throzyten (Siderin; Howell-Jolly-Bodies) (s)
- Eliminierung freier Korpuskel (Zelltrümmer;
Bakterien; Hämosiderin) (s)
- Eliminierung gealterter Erythrozyten (durch
Phagozytose oder Aufspaltung in Bruchstücke
oder Auflösung von Innen her) (s)
- Eliminierung vorgeschädigter Leukozyten
(und evtl. Tumorzellen) (s)
- Thrombozytenabbau (BLAUSTEIN 16) (w)
- Myelopoese (unter bes. Bedingungen) (s)
- Lymphopoese (s)
- Einfluß auf Blutungszeit (UNGAR 134;
SAVITSKY 115) (w)
- Einfluß auf die Kapillarresistenz
(AUINGER 11) (w)
- Beeinflussung der Myokardleistung bei
O₂-Mangel (REIN 106) (w)

A 1.2 Regulation:

- Von neurovegetativer Lage abhängige Produk-
tion humoraler Wirkstoffe mit Zielrichtung auf
Knochenmark und/oder peripheres Blutbild
(weiße Reihe, siehe A 2) (w)

- Zeitweilige Hemmung der Erythropoese, evtl. durch antimitotischen Retikulozytenfaktor (MAURICE 92) (w)
- Ausgleichender Effekt auf das Neurovegetativum (KAISER 76; BLAUSTEIN 16) (w)
- Entgiftungsfunktion (w)
- Beziehungen zu endokrinen Drüsen (DIETTRICH 32; HIRTMAIR 74; KATZ 76, 77; LINKE 89; RINDT 109, 110; SCHLIEPHAKE 118; UNGAR 134) (s)
- Beziehungen zum Eisenstoffwechsel (v.a. Speicherung, aber auch beteiligt beim Einbau ins Hb-Molekül: HEITMEYER in 73) (s)
- Beziehungen zum Eiweißstoffwechsel (RUDILLON 19) (w)
- Beziehungen zum Nukleinsäurestoffwechsel (KUPFF in 146) (w)
- Ausgleichende Funktion im Kohlenhydrat-Haushalt (MEYTHALER 94) (w)

A 1.3

Abwehr:

- Unterdrückung von Geschwulstwachstum (RIGLER 107 am Dezipuum der Ratte, ARAKI 9 an Ehrlich-Aszites-Tumor-Zellen) (w)
- Anregung von Granulationsgewebe (TÜNNERHOFF 132, 133; vgl. auch BÜCHNER 20) (w)
- Schutzwirkung gegen Strahlenschäden (COLE 24; DIETHELM 33; DOUGLASS 36; ELLINGER 38; FORD 47; LADNER 85; PETERSEN 101; evtl. über verstärkte Enzymaktivitäten: HAGEN 60) (s)

- Organ der Antikörperbildung (BURCKHARDT 21;
HALPERT 62; HITTMAIR 73; LAUDA 87) (s)

Alle diese Vorgänge laufen entweder in den verschiedenen Systemen der Milz selbst ab oder in Erfolgsorganen, die mit der Milz mittels dreier Wege verbunden sein können:

1. vegetativ-nervös
2. hormonell-endokrin
3. humorale Wirkstoffe

Rein hormonelle Einflüsse der Milz wurden immer wieder postuliert, aber nie bestätigt; es findet sich auch für eine eigentliche innersekretorische Milztätigkeit kein morphologisches Substrat.

Den beiden anderen Systemen wurde in mannigfachen Versuchen nachgegangen; es scheint, daß sich beide Systeme nicht exakt trennen lassen, vielmehr befindet sich die Milz - als unwillkürlich tätiges Organ neurovegetativ gesteuert - in einem umfassenden Regelkreis. Die Steuerung der Milz scheint dabei hormonell (NNR) und neurovegetativ, die Antwort darauf z.T. in der Produktion humoraler Wirkstoffe zu erfolgen.

A 2 H u m o r a l e W i r k s t o f f e

Hinweise auf humorale Milzfaktoren, mit Angriffspunkten v.a. im Blutsystem - wie wir sie auch in unserer Arbeit suchten - sind zahlreiche vorhanden:

A 2.1

- BANTI (12) machte 1883 auf Beziehungen zwischen Milz und Knochenmark aufmerksam, indem er die "anaemia splenica" als Folge einer chronischen "Vergiftung" auffaßte, deren Ursache in der Milz liegen könnte, wobei die Milz solche "vergiftenden" Faktoren produzieren sollte.
- FRANK (48) sah 1916 eine humorale Beeinflussung des Knochenmarkes durch die Milz ("splenogene Markhemmung").
- SCHLIEPHAKE (118) erkannte die Einordnung verschiedener Einzelbefunde in ein vegetativ-nervös-humorales System, wobei die Milz verschiedene Anpassungsvorgänge lenke.
- UNGAR (134) nahm an, daß zwischen Hypophyse und Nebenniere einerseits und Milz andererseits gewisse Beziehungen bestünden und daß die Milz einen Wirkstoff, das "Splenin", absondere.
- BOCK und FRENZEL (17) glaubten 1938 einen lienalen Hemmstoff exakt gefunden zu haben, als beim Kaninchen nach Umleitung des Milzvenenblutes und der Umgehung des Pfortader-Kreislaufes in die v.cava inf. Zytopenien auftraten. Bestätigt wurden sie von verschiedenen Untersuchern, so KISSMEYER-NIELSEN (81) 1951, widerlegt 1953 von PALMER (98), 1963 WEINREICH (136), 1955 HEILMEYER (69).
- Einen sicheren Einfluß scheint die Milz mittels humoraler Faktoren auf die Erythropoese zu besitzen, was zahlreiche Beobachter sowohl im Tierexperiment als auch beim splenektomierten Menschen fanden (z.B. DAMESHEK 29; STREICHER 126). Besonders eindrucksvoll sind

in diesem Zusammenhang die Parabioseversuche von HIRSCHFELD (72) 1914 und 1928 von LAUDA (86), die zeigten, daß die Jollykörper, ein stets auftretendes Phänomen nach einer Splenektomie, erst erschienen, wenn man bei b e i d e n Parabiosepartnern die Milz entfernte. Die Milz eines Tieres schützt also auch das zweite vor der Jollykörperbildung, was den Schluß auf eine humorale Wirkungsweise zuläßt.

- Hämolytisch wirksame Faktoren fand auch RUHENSTROTH-BAUER (113) 1972, der sie schon etwas näher einordnen konnte (ätherlöslich, Gruppe der langkettigen Fettsäuren) und als Hypothese aufstellte, daß die gefundenen Wirkstoffe ihrerseits durch Lysosomen-Enzyme der Milz freigesetzt werden und dann Erythrozyten hämolysieren können ("Zweischrittmechanismus").
- Die Ausschwemmung humoraler Faktoren nach Milzbestrahlung nahm LI (88) an, der eine Besserung chron. Leukämiepatienten mit Abnahme der Leukozytenzahlen 36 Stunden nach Milzbestrahlung beschrieb.

A 2.2 Durch Beobachten der postoperativen Symptome nach einer Splenektomie glaubte man die jeweils ausgefallenen Milzfunktionen rekonstruieren zu können:

- Allgemein war die Beobachtung, daß vorher abgesunkene Zellzahlen des peripheren Blutes nach Milzexstirpation wieder stark anstiegen (HEILMEYER 69; LIPSON 90; BURKHARDT 21; FRESSEN 49; PALMER 98; STREICHER 128; ZWICKER 147; Eosinophile steigen anscheinend nicht besonders an: ESSELLIER 42; Lymphozyten werden nach Splenektomie evtl. verstärkt vom Thymus freigegeben: ERNSTRÖM 40, oder steigen evtl.

auch auf Grund vegetativ-nervöser Einflüsse:
BEGEMANN 13).

- Bei Patienten mit
Pancytopenien (FERRATA 44)
bestimmten hämolytischen Anämien (ZWICKER 148; CROSBY 28)
Myelofibrosen (WETHERLEY 139; CROSBY 28)
bestimmten Sichelzellanämien (STEVENS 125)
z.T. chron.lymph.Leukämien (CHRISTENSEN 22;
vgl. dagegen McENDY 39)
stellte sich nach Splenektomie eine Besserung
bzw. Normalisierung des peripheren Blutbildes
ein.
- STREICHER (126, 128) und FRESEN (49) legten
in umfassenden Tierversuchen die Folgen der
Splenektomie mit Wiederanstieg der Leukozyten
und Erythrozyten dar.
- PALMER (98) zeigte 1953 in einer sehr interes-
santen Versuchsreihe, daß sich die Folgen einer
Splenektomie dann n i c h t einstellten, wenn
geringe Teile des Milzgewebes im Organismus be-
lassen wurden oder postoperativ Milzextrakt
verfüttert wurde.
- Zahlreiche Untersucher berichten von der mög-
lichen künstlichen Herstellung einer Splenome-
galie mit den entsprechenden Symptomen und de-
ren Verschwinden bei folgender Splenektomie
(JAEGER 75; BÜCHERL in 42; PALMER 98; WENN-
BERG 137; ZWICKER 147).
- Bei Parabioseversuchen (PALMER 98) stellte
sich die postoperative Leukozytose (die milz-
spezifisch ist und nach anderen Operationen
viel geringer ausfällt, vgl. HEILMEYER 69)
erst dann ein, wenn bei beiden Partnern die
Milz entfernt war - ein weiterer Hinweis hu-
moraler Milztätigkeit.
- Auch die Zahl der Megakaryozyten scheint von
der Milz gesteuert: CROSBY (27) fand 1962,

daß bei Ratten nach Splenektomie eine Zunahme, bei Splenomegalie eine Abnahme der Zahl der Megakaryozyten auftrat; bestätigt 1970 von ROLOVIC 111.

- Das Fehlen humoraler Wirkstoffe nach Splenektomie belegte sehr eindrucksvoll TARNUZI (131): er sah, daß nach Splenektomie - wie erwartet - die Leukozyten- und Thrombozytenzahl stark anstieg, bei Reimplantation von Milzgewebeteilen in sog. "milli-pore-chambers" die Zellzahlen wieder sanken. Da diese "Kammern" für Zellen nicht passierbar sind, muß die Wirkung von subzellulären Stoffen ausgegangen sein (und kann auch nicht durch Sequestrierung erfolgt sein).
- Daß die Beeinflussung der Blutzellzahlen durch die Milz sich evtl. auch auf andere Organe zu richten vermag, zeigte ERNSTRÖM (40), bei dessen Splenektomieversuchen eine erhöhte Lymphozytenausschwemmung aus dem Thymus nachgewiesen wurde (Meerschweinchen).

A 2.3 Scheinbar gesteigerte Milzfunktionen, auch experimentell auslösbar, bedurften einer langen Untersuchung, bis unter dem Begriff eines Hyersplenismus allgemein folgendes verstanden wurde (DAMESHEK 29; HEILMEYER 69; GROSS 57; STREICHER 127; FISCHER 46): 1. Periphere Zytopenie, 2. Zellreiches Knochenmark, 3. (meist) Splenomegalie, 4. günstiger Erfolg einer Milzexstirpation auf das Blutbild.

- Mit verschiedensten Methoden ließen sich Splenomegalie und die Symptome des Hypersple-

nismus experimentell hervorrufen (z.B. JAEGER 75; KISSMEYER-NIELSEN 81; PERETS-TAMAYO 100) in dem Bestreben, bei einer hyperaktiven Milz eventuelle humorale Faktoren leichter zu isolieren (was nicht gelang).

- Den besonderen Einfluß der Milz bei Splenomegalie auf die Erythrozyten im Sinne einer Zerstörung zeigte STUTTE (129).
- Manche Autoren glaubten in hypersplenischen Milzen humorale Faktoren gefunden zu haben (so PERETS-TAMAYO 100 einen Faktor für Thrombozytopenie oder COMTIER 25, der u.a. auch mittels eines aus einer menschlichen Hyperspleniemilz gewonnenen Extraktes bei Injektion am Kaninchen alle Symptome des Hypersplenismus übertragen konnte).

Insgesamt scheinen beim Mechanismus des Hypersplenismus vier Deutungen möglich (vgl. GROSS 57):

1. Verstärkte humorale Beeinflussung des Knochenmarks durch die Milz
2. Hemmung oder Zerstörung eines an einem anderen Orte gebildeten myelotropen Stoffes durch die Milz
3. Verstärkte Sequestrierung von Blutzellen durch die Milz
4. Vermehrte Produktion von (Auto-)Antikörpern durch die Milz

Die Beantwortung, welche These die richtige ist (evtl. auch mehrere), ist derzeit noch nicht möglich. Es scheint aber, daß eine hypersplene Milz nicht die gesteigerte Funktion einer normalen darstellt (HEILMEYER 69; HAAM 59) und daß deswegen auch beim Hypersplenismus humorale Wirkstoffe nicht bewiesen werden können, da nicht verstärkte humorale Aktivität im

Vordergrund steht (CROSBY 26; REIMANN 105; MEY-
THALER 94; WEINREICH 136; KUNZ 84; HAMILTON 63).

- Interessant sind die Ergebnisse von PÖTT-
GEN (103), der 1972 mit Zellmarkierungsver-
suchen zu der Ansicht kam, daß "morphologisch
und funktionell ... Hypersplenismus die all-
einige Folge einer vermehrten Aufnahme und
verstärkten Zerstörung von peripheren Blut-
zellen in den erweiterten Filtrationsräumen
einer vergrößerten Milz (ist)"
- BLACK (15) zeigte 1955, daß in hypersplenen
Milzen auch veränderte Enzymaktivitäten zu
finden sind (Dehydrogenase-Aktivität).

A 2.4 Schließlich wird eine Nachahmung der Milzfunktion
bzw. einzelner Teilfunktionen mit verschiedenen her-
gestellten Extrakten aus normalen und hypersplenen
Milzen versucht (vgl. Teil E). Diese Extrakte (die
noch nicht den Wirkstoff darstellen, vgl. HITT-
MAYER 74) zeigen je nach Ausgangslage der Milz
(vorhergehende Vagus- oder Sympathikusreizung u.a.)
und Herstellung (anabole/katabole Extrakte; alka-
lische/saure Extrakte; Azeton-, Benzol-, Ätherex-
trakte usw.) verschiedene Wirkungen; sie zeigen
aber immer wieder das Vorhandensein bestimmter hu-
moraler Wirkstoffe:

- Untersuchungen mit Extrakten aus hypersplenen
und normalen Milzen (auch in unserem Labor
durchgeführt: SCHMIDT 117; NEUMAYR 96; RIND-
FLEISCH 108; SCHÜRENBERG 120) zeigten im peri-
pheren Blutbild eine Leuko- und Lymphopenie.
(Sie verhinderten auch das Auftreten von großen
mononukleären Zellen nach Splenektomie

(ROSENKRANZ 112).

- Aus Hyperspleniemilzen menschlichen und tierischen Ursprunges, später auch aus normalen Kälbermilzen gewannen WOLF und GERLICH (143) 1955 einen Extrakt, der bei 3 Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie sowie bei chron. myeloischen Leukämien zu einer (zeitlich begrenzten) Remission führte. Z.T. wurden auch Remissionen bei oraler Gabe von (roher) Milz beobachtet.
- Mit Milzextrakten aus normalen und hypersplenischen Milzen gelang es LOZZIO (91) 1972, leukämische Zellkulturen nach 2 Wochen zum Absterben zu bringen.
- CROSBY (27) zeigte 1962, daß die Verfütterung von roher Milz und verschiedenen hergestellte Milzextrakte bei Ratten, Kälbern und Hunden zu einer länger dauernden Panzytopenie führen.
- COTTIER (25) demonstrierte die Übertragbarkeit einer (tierischen) Panhämozytopenie durch einen zellfreien Milzextrakt.
- Wird der Milzextrakt fraktioniert, so scheint in einer bestimmten Fraktion ein die Granulopoese fördernder Milzwirkstoff vorhanden zu sein. Mit diesem Extrakt erzielten WOLF und GERLICH (143) gute Erfolge bei der Behandlung von Leukämien.
- GOSTOMZYK (54, 55) fand bei normalen Milzen von Ratten und Rindern einen Stoff, der die Ausschwemmung membranunreifer Granulozyten aus dem Knochenmark stimulierte ("Granulomovin"; Molekulargewicht $\sim 10\,000$, neuraminsäurehaltiges Peptid).
- v. ALBERT (2 - 6) fand bei eiweißfreien Milzextrakten aus menschlichen und tierischen Hyperspleniemilzen eine Proliferations- und Reifungshemmung der myeloischen Zellen.

- In verschiedenen Geweben, in besonderer Konzentration in der Milz, fand SAVITSKY (115) einen die Blutungsdiathese senkenden Faktor.
- TUNNERHOFF (132) beschrieb den positiven Einfluß von Milzextrakten bei der Entwicklung von Granulationsgewebe.
- Milzextrakte verringern oder verhindern verschiedene Strahlenauswirkungen und verlängern die Überlebenszeit nach Letaldosen (CHING 38; FORD 47; ALLEN 7; BERENBLUM 14).
- Durch Anwendung von Milzextrakten konnte BRENT (17) 1970 die Überlebenszeit von Hauttransplantaten verlängern.
- Einen nekrotropen Effekt von Milzextrakten auf die Leber beschrieb EGGER (37).

A 3 B e g r ü n d u n g u n d F o r m u l i e r u n g d e r e i g e n e n A r b e i t

Die oben angeführten Beobachtungen bei Splenektomie, Hypersplenismus und Anwendung von Extrakten zeigen immer wieder, daß sich verschiedene Milzfunktionen nicht ausschließlich durch (vermehrte) Sequestrierung und/oder Zellzerstörung in der Milz erklären lassen. Darum sollte auch in der vorliegenden Arbeit durch Herstellung und Anwendung von wasserlöslichen, zellfreien Milzextrakten aus normalen Kälbermilzen die Einflußnahme der Milz auf das periphere Blutbild, vor allem auf das Verhalten der Leukozyten weiter untersucht werden. Die parallel dazu durchgeführten Serumextrakt-Versuche sollten der Klärung der Frage dienen, inwieweit die von der Milz ausgeschütteten

Stoffe ins Serum gelangen. Zwei Versuchsgruppen lassen sich untergliedern: a) Auswirkungen von Milzextrakten auf das Blutbild gesunder Tiere und b) Beeinflussung von Blutbild und Überlebensrate lymphadenotischer Tiere.

B M A T E R I A L U N D M E T H O D I K
(Präparation und Versuche)

B 1 H e r s t e l l u n g v o n e i n f a c h e n
E x t r a k t e n

Da es wichtig war, möglichst frisches Material zu erhalten, wurde es jeweils am Tage der Verarbeitung in einem nahegelegenen Schlachthof geholt und sofort weiterverarbeitet. Wir gewannen Extrakte aus Kälbermilzen und Kälberblut. Das Alter der geschlachteten Tiere lag zwischen 6 und 8 Wochen. Für die Verarbeitung der Organextrakte wurden zahlreiche verschiedene Verfahren angewandt; bewährt und eingehend getestet wurden folgende Modifizierungen:

B 1.1 Einfacher Milzextrakt (ME)

Eine bestimmte Menge Milzgewebe (i.a. jeweils 1 kg) wurde zerkleinert, von Faszien und Kapselgewebe grob gereinigt, mit aqua bidest. 1 ad 4 versetzt und mit dem Ultra-Turrax (Fa. Janke & Kunkel, Staufen) homogenisiert.

Anschließend erfolgte eine 48-Stunden-Dialyse gegen die 5-fache Menge aqua bidest (Visking Dialysierschlauch Typ 27/32; Fa. Serva, Heidelberg). Der mittlere Porenradius dieses Dialysierschlauchs liegt bei 24 Å, d. h. Substanzen mit einem Molekulargewicht über $\sim 20\,000$ werden abgetrennt. Um bakteriellen Verunreinigungen zu begegnen, wurde a) die Dialyse bei 4° C durchgeführt und b) der Dialyseflüssigkeit je 100 mg/l Ampicillin und Stenopor zugesetzt. Das Dialysat wurde im Rotationsverdampfer Tom (Fa. Wertheim) in einem 20 l Kolben auf ca. 800 ml eingedampft (Wasserbadtemperatur 47° C,

Dampftemperatur 29 - 31° C bei einem Druck von 30 - 60 mm Hg). Der Rückstand wurde zentrifugiert (10 min., 3 000 U/min.), filtriert und säulenchromatographisch gereinigt.

Diese säulenchromatographische Reinigung ("Entsalzen") wurde in 2 Schritten durchgeführt: zuerst mit einer Säule 81 x 14,2 cm, dann mit einer Säule 90 x 2,5 cm, beide gefüllt mit Sephadex G - 10 (Fa. Serva, Heidelberg). Dieser Geltyp besitzt einen Fraktionierungsbereich von 0 - 800 Molekulargewicht. Gesammelt wurde das Ausschlußvolumen, d. h. Stoffe mit einem Molekulargewicht von $>700 - 800 < 15\,000$. Die Volumenverkleinerung zwischen den beiden Säulenläufen wurde mittels des schonenden Lyophilisierverfahrens durchgeführt (Gefriertrockner Gamma, Fa. Christ, Osterode).

Der letzte Trockenrückstand nach 2 x G - 10 wurde in soviel physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen, daß 0,1 ml Lösung 5 g Frischgewebe entsprachen, und bis zur Injektion bei - 15° C aufbewahrt.

B 1.2 Einfacher Serumextrakt (SE)

Einfache Serumextrakte wurden nach dem gleichen Verfahren hergestellt wie der unter B 1.1 hergestellte Milzextrakt. Statt des Versetzens 1 ad 4 mit aqua bidest. wurde als Ausgangsmenge 4 l Serum genommen (gewonnen durch Zentrifugieren 30 min. bei 3 000 U/min. und 4° C). Der letzte Trockenrückstand im Gefriertrockner nach 2 x G - 10 wurde beim Serum in soviel physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen, daß 0,1 ml Lösung 10 ml Serum entsprachen.

Abb. 1 gibt einen Überblick über die Herstellung der einfachen Extrakte und die Einschränkung des Molekulargewichts.

B 1.3 Gewaschene Erythrozyten

Nach Zentrifugieren und Absaugen des Serumüberstandes wurde der Erythrozytenrest zweimal mit physiolo-

PRÄPARATIONSSCHRITTE	VOLUMEN	MOLEKULARGEWICHT
Homogenisierung 1 ad 4 Vol. aqua bidest.	4 l	0 
Dialyse des Homogenates 24 h gegen 5 Vol. aqua bid.	20 l	0  20000
Eindampfen im Vakuum-Rotations- verdampfer	700 ml	
Gelfiltration G-10 (14,2 x 81 cm)	2500 ml	700  20000
Lyophilisation	Trocken- substanz	
Gelfiltration G-10 (2,5 x 90 cm)	600 ml	
Lyophilisation	Trocken- substanz	

Abb. 1: Herstellung "Einfacher Milzextrakt" (ME)
und "Einfacher Serumextrakt" (SE)

rischer NaCl-Lösung gewaschen. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie unter B 1.1.

B 1.4 Zweite Dialyse

Verschiedentlich, gerade auch für die später durchgeführten Dauerversuche, wurde eine zweite Dialyse angewandt. Diese diente der vollständigeren Abtrennung höhermolekularer Substanzen, die bei länger dauernden Versuchen evtl. immunologische Reaktionen zur Folge haben. Die Dialyse wurde bei 4° C 20 Stunden lang durchgeführt, im Volumenverhältnis 1 : 20.

B 2 Herstellung von fraktionierten Extrakten (Säulenchromatographie)

B 2.1 Präparation

Erwähnt wurde schon die Verwendung der Gel-Chromatographie beim ersten Schritt jeder Extrakterstellung, beim "Entsalzen". Bei diesem präparativen Verfahren wurden zwei Säulen mit Sephadex-G-10 verwendet. (81 cm x 14,2 cm bzw. 90 x 2,5 cm). Als Elutionsmittel wurde aqua bidest. verwendet (ohne Pumpensog). Gesammelt wurde das Ausschlußvolumen (Molekulargewicht >700) ohne Fraktionierung.

B 2.2 Analyse

Zur weiteren Auftrennung der Extrakte (Einengung des Molekulargewichts, Fraktionierung) wurden Säulen mit Sephadex G - 25 (5 x 150 cm) und G - 25 (90 x 2,5 cm) sowie G - 50 (5 x 60 cm) und G - 50 (7,5 x 90 cm) verwendet.

Abb. 2 bringt eine Übersicht über die verwendeten Säulen und ihre Fraktionierbereiche.

Sephadex-Typ	Säulengröße (cm)	H ₂ O-Aufnahme- vermögen (ml/g)	angenäherter Fraktionier- bereich (MG)
G - 10	81 x 14,2 90 x 2,5	1,0 ± 0,1	- 700
G - 25	150 x 5 90 x 2,5	2,5 ± 0,2	1000 - 5000
G - 50	60 x 5 90 x 2,5	5,0 ± 0,3	5000 - 30000

Abb. 2: Angewandte Sephadex-Typen mit wichtigen Eigenschaften und den verwendeten Säulengrößen (vgl. DETERMANN 31; ANDREWS 8)

Über die Variation und die Fraktionierungen der einzelnen Läufe soll bei den entsprechenden Versuchen berichtet werden; allen analytischen Trennverfahren gemeinsam war (vgl. Abb. 3):

Der chromatographische Prozess wurde quantitativ gemessen, wobei die Transmission im Bereich der Peptidbanden des Eluates durch einen Detektor registriert wurde (Spektralphotometer DBG-Grating; Fa. Beckmann). Die Extinktion wurde bei 280 μ bzw. 240 μ mit einer Quarzdurchflußkuvette kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet (10-Zoll-Recorder, Fa. Beckmann). Gleichzeitig wurde das Eluat in Fraktionen, die gemäß den bei der Transmissionsmessung erhaltenen Peaks eingeteilt wurden, gesammelt (Fraction Collector Radi Rac 3403 B, Fa. LKB). Als Trennmedium wurde z.T.

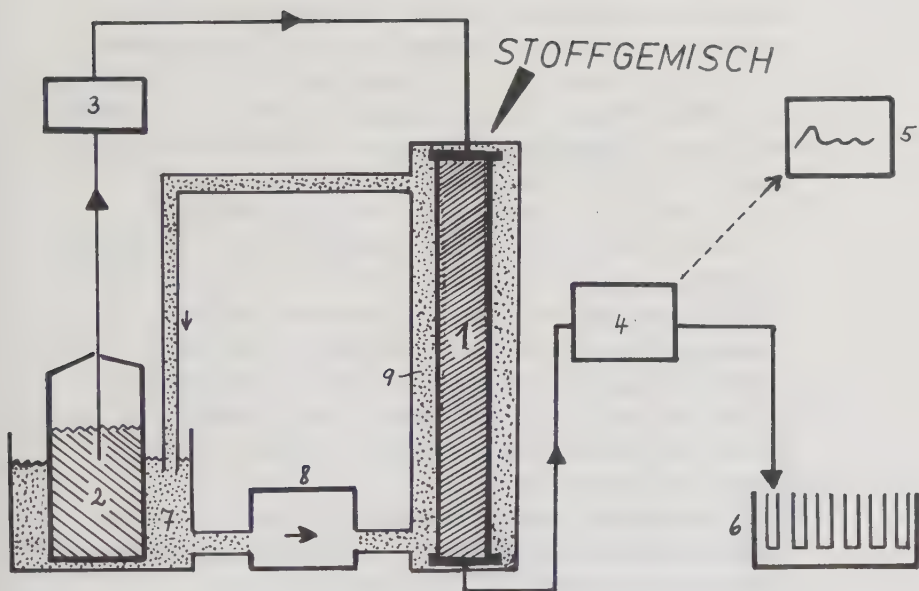


Abb. 3: Versuchsanordnung
bei analytischen Trennverfahren

Die Auftrennung des Stoffgemisches geschieht in der Säule (1), indem es mit dem Elutionsmittel (2) mit Hilfe einer Pumpe (3) durch das Gelbett hindurchgewaschen wird. Über Schlauchverbindungen wird das Eluat zum Detektor (Photometer, 4), der mit einem Schreiber verbunden ist (5) und zum Fraktionssammler (6) geleitet. Die umlaufende Kühlung erfolgt aus dem Kühlwassergefäß des Elutionsmittels (7) über eine Pumpe (3) durch den Kühlmantel der Säule (9).

aqua dest., z.T. 0,01 n Ammoniumcarbonat $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ zur Verhinderung einer Wechselwirkung zwischen gelösten Ionen und Gel verwendet. (Diese Wechselwirkung kann durch eine geringe Zahl von Carboxylgruppen an der Matrix bei Trennmedien mit Ionenstärken $< 0,02$ erfolgen und wird durch den flüchtigen Puffer $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ mit einer Ionenstärke von 0,03 vermieden; Ammoniumcarbonat wird beim Lyophilisieren wieder vollständig eliminiert). Jeder Lauf erfolgte unter Kühlung: a) Raumtemperatur 18°C und/oder b) umlaufende Kühlung der Spülflüssigkeit mit Pumpe und Kühlmantel (Zufluß 2°C). Ein gleichmäßiger Säulendurchfluß wurde durch Pumpensog bewirkt (Re Cychrom Peristaltic-Pump Type 4912 A, Fa. IKB). Das aufgetragene Probevolumen lag bei G - 25 zwischen 8 und 24, bei G - 50 zwischen 20 und 100 ml, die Durchflußgeschwindigkeit betrug je nach Versuch zwischen 102 und 157 ml/h.

Zur Korrelation von Eluatvolumen und Molekulargewicht wurden die Säulen mit folgenden Substanzen geeicht (Eichkurven vgl. Abb. 4 und 5):

Dextranblau	MG	~2 Mill.
Myoglobin	MG	16 000
Cytochrom C	MG	11 600
ACTH (Schwein)	MG	5 300
Ocytocin	MG	1 007

B 3 P e p t i d - u n d p H - M e s s u n g e n

Nach einzelnen Verarbeitungsschritten wurde der Peptidgehalt der Extrakte geprüft: Der Peptidgehalt nach 2 x G - 10 betrug ca. 720 mg/kg Milz (180 g Protein/kg Milz; DOCUMENTA GEIGY 142); der Protein- bzw. Peptidgehalt einer Einzeldosis (0,1 ml, 5 g Äq) ist dann 3,6 g%. Nach der 2. Dialyse betrug der Peptidgehalt noch 320 mg/kg Feuchtgewicht Milz.

pH - Messungen ergaben:

pH nach Rotationsverdampfer	6,3
pH nach 2 x G - 10	6,8

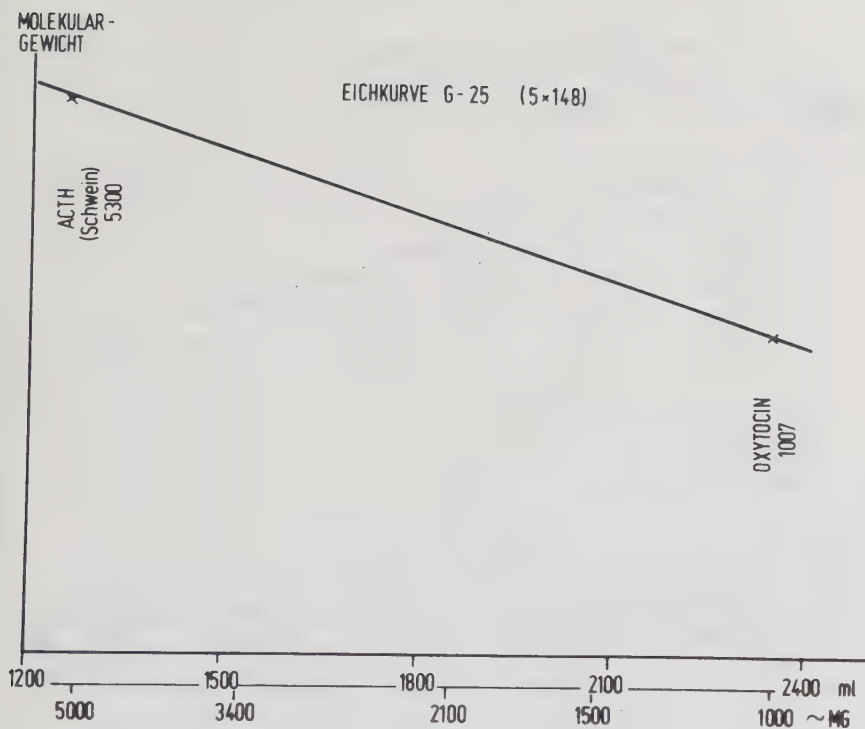


Abb. 4: E i c h k u r v e G - 25

Auf der Ordinate Angabe des Molekulargewichtes,
auf der Abszisse sind die dazu ermittelten Eluat-
volumina eingetragen

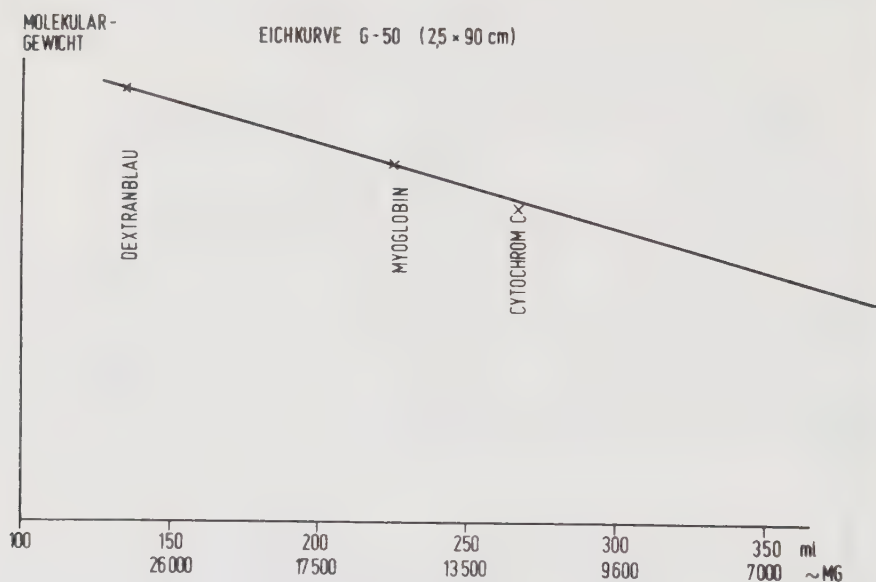


Abb. 5: Eichkurve G-50

Auf der Ordinate Angabe des Molekulargewichtes,
auf der Abszisse sind die dazu ermittelten Eluat-
volumina eingetragen.

B 4 T i e r v e r s u c h e

B 4.1 Tiere

B 4.1.1 Intakte Mäuse

Die Auswirkungen der verschiedenen Extrakte und Fraktionen auf das weiße Blutbild wurden an weiblichen NMRI - Mäusen untersucht (Versuchstierfarm Voss, Tuttlingen). Das Gewicht der Mäuse betrug 20 bis höchstens 30 g.

Zunächst wurden die Tiere bald nach dem Eintreffen einer Sendung für die Versuche verwendet; im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, daß eine geringere Streuung der Gesamtleukozytenwerte zu erzielen war, wenn die Tiere unter gleichbleibenden Bedingungen ca. 3 Wochen in unserem Tierstall gehalten wurden (evtl. Überstehen anfänglicher Infekte).

Grundsätzlich wurden, da sich die einzelnen Tier-sendungen hinsichtlich der Leukozytenzahlen stark unterschieden (trotz annähernd gleichen Alters und Gewichtes), Vergleiche im weißen Blutbild nur innerhalb e i n e r Tiersendung angestellt und auch die NaCl - Kontrollgruppen jedesmal neu aufgestellt. Es stellte sich auch heraus, daß es schwierig ist, eng gezogene Grenzen für die "normales" weißes Blutbild der Maus anzugeben.

B 4.1.2 Mäuse mit akuter lymphatischer Leukämie

Untersuchungen an leukämischen Mäusen und Auswirkungen verschiedener Extrakte auf Überlebenszeit und Blutbild wurden an weiblichen Tieren des Stammes C 57 Bl/6/J vorgenommen (Yackson Lab., Chicago). Bei diesem Stamm lassen sich leukämische Zellen (Ursprung: spontan) gesunden Tieren übertragen (vgl. FEY 45; PEDERSEN 99), so daß diese ca. eine Woche nach Inoculation eine Leukämie mit einer Überlebenszeit von ca. 7 - 10 Tagen zeigen (vor 2 Jahren noch etwas länger; evtl. spontane Mutation). Den gesunden Tieren, die ebenfalls zuerst ca. 3 Wochen in unseren Tier-

ställen gehalten wurden, injizierten wir intraperitoneal eine Suspension von Milzzellen leukämischer Tiere des Stammes C 57 Bl/6/J (1×10^6 Zellen/0,2 ml/Tier), der in unseren Laboratorien seit mehreren Jahren durch in ca. 6tägigem Abstand erfolgende Transplantationen als Leukämieträger dient. Die Transplantierbarkeit erscheint streng stammspezifisch ohne Anwendung von Immunsuppressiva. Eine ausgeprägte Leukose mit $50 - 60 \text{ OOO/mm}^3$ wurde im peripheren Blutbild erst am 7. Tag sichtbar (an dem die ersten Tiere schon starben). Nach unseren Versuchen zeigten die CBL - Tiere ein homogeneres Blutbild als die NMRI - Mäuse.

B 4.2

Haltung der Tiere

Die Tiere wurden in Gruppenkäfigen unter möglichst gleichbleibenden Bedingungen gehalten und mit Altromin (Altromin GmbH, Lage) und Wasser ernährt.

B 4.3

Einzeldosis und Injektion

Der Trockenrückstand nach dem letzten Lyophilisieren wurde in so viel physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, daß 0,1 ml beim Serum 10 ml Äq und bei der Milz 5 g Äq entsprachen (Ausnahmen bei den Versuchen angegeben). Das Volumen einer Einzeldosis betrug jeweils 0,1 ml, die mit einer Tuberkulinspritze intraperitoneal appliziert wurden (Desinfektion mit Merfen, leichte Äthernarkose).

B 4.4

Blutabnahme und Auswertung

Zu den bei den jeweiligen Versuchen angegebenen verschiedenen Zeitabständen nach der Injektion wurde den Tieren aus einem Schwanzgefäß 0,02 ml Blut entnommen sowie ein Ausstrich angefertigt. Von jedem Tier wurde nur einmal Blut entnommen, um Reaktionen des hämopoetischen Systems auf mehrmalige Entnah-

men oder "falsche" Werte durch mögliche Infektionen nach der nichtsterilen Abnahme zu vermeiden. Es zeigte sich auch, daß jegliches Drücken und Pressen bei der Abnahme möglichst vermieden werden sollte, da es die Leukozytenzahlen sehr stark beeinflusste.

Die Zählung der Leukozyten erfolgte im Coulter Counter (Modell B, Fa. Coulter Elektronik, London), die Ausstriche wurden in üblicher Weise nach Pappenheim gefärbt. Im Differentialblutbild wurden je 200 Zellen ausgezählt (Eosinophile, Stabkernige, Segmentkernige, Lymphozyten, Monozyten). Bei den CBL - Mäusen wurde z.T. auch die Hämoglobinkonzentration bestimmt.

B 5 S t a t i s t i s c h e A u s w e r t u n g

Die unterschiedlich behandelten Gruppen bestanden aus mindestens 15, i.a. jedoch aus 20-25 Tieren. Die Relativzahlen der Differentialblutbilder wurden in absolute Zellzahlen umgerechnet. Von diesen sowie von den Gesamtleukozytenzahlen bestimmten wir pro Gruppe

- den Mittelwert $\bar{x}$
- die Standardabweichung des Mittelwertes $\sigma_{\bar{x}}$
- die Standardabweichung σ
- den Variationskoeffizienten V_K

Der statistische Vergleich wurde immer mit den absoluten Zellzahlen durchgeführt.

Die Berechnung der Prüfverteilungen und Signifikanzen wurde nach den Anleitungen von SACHS (114), mit Zuhilfenahme der Wissenschaftlichen Tabellen DOCUMENTA GEIGY (142) durchgeführt.

Nach Eliminierung aller Werte außerhalb der 2σ - Grenzen wurde auf angenäherte Normalverteilung mit dem David-Test geprüft; sprach dieser Test für eine Normalverteilung (was i.a. zutraf), wurde im t - Test (Studentverteilung) die Prüfung auf signifikante Un-

terschiede bei zweiseitiger Fragestellung auf dem 5% Niveau durchgeführt (demzufolge wurden bei den Abbildungen auch alle jene Werte als signifikanz bezeichnet, bei denen $p < 0,05$ ist). Sprach der David-Test für das Vorliegen nicht-normalverteilter Stichproben, wurde der Homogenitätstest nach Kolmogoroff und Smirnow zum Vergleich unabhängiger Stichproben angewandt.

Die ermittelten Parameter der Häufigkeitsverteilungen der einzelnen Kollektive wurden z.T. graphisch erfaßt (S. 148-178).

Alle Berechnungen wurden mit einem Tischcomputer durchgeführt (Programma 101, Fa. Olivetti).

C

ERGEBNISSE MIT NMRI - TIEREN

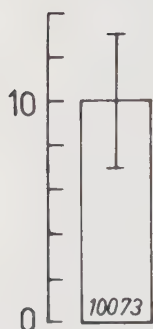
C 1

Blutbild unbehandelter Tiere

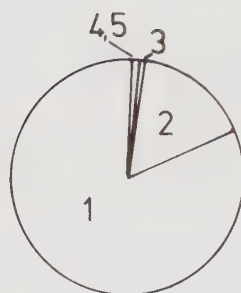
An 30 Tieren wurde versucht, das weiße Blutbild unbehandelter NMRI-Tiere (als "Normalkollektiv") zahlenmäßig zu erfassen. Beim Vergleich mit einem zu einem anderen Zeitpunkt nochmals bestimmten Kollektiv zeigte sich, daß die Werte der Gesamtleukozyten, Granulozyten und Lymphozyten um rund 20% schwanken. Noch größere Schwankungen ergeben sich bei den Eosinophilen (wegen der geringen Zahl) und bei den Monozyten (wegen der oft schwierigen Abgrenzung gegenüber großen Lymphozyten).

Im einzelnen konnte aber als in etwa "normal" festgehalten werden (Abb. 6): Gesamtleukozyten 10070 ± 3070 , Eosinophile 22 ± 20 , Stabkernige 40 ± 30 , Segmentkernige 1650 ± 820 , Lymphozyten 8190 ± 2750 , Monozyten 150 ± 110 ; Erythrozyten 7 Mill. $\pm 1,5$ Mill.; Hb $15,8 \pm 1,4$. Der Kernverschiebungsindex betrug 0,024. (Alle Zahlen in guter Übereinstimmung mit den von COHRS 23 angegebenen Werten).

Vgl. auch S.148 - 149



LEUKOZYTEN



DIFFERENTIAL-
BLUTBILD:

- 1 = LYMPHOZYTEN 8189 = 81,9 %
- 2 = SEGMENTKERNIGE 1660 = 16,5 %
- 3 = MONOZYTEN 151 = 1,5 %
- 4 = STABKERNIGE 40 = 0,4 %
- 5 = EOSINOPHILE 22 = 0,2 %

Abb. 6: Weißes Blutbild
unbehandelter Tiere
(n = 30)

C 2 V e r h a l t e n d e s B l u t b i l d e s
n a c h e i n f a c h e m M i l z - u n d
S e r u m e x t r a k t (vgl. S.150 - 165)

In diesem Versuch wurde der zeitliche Verlauf der Verschiebungen der Gesamtleukozyten und des Differentialblutbildes nach einer e i n m a l i g e n Extraktinjektion geprüft. Verwendet wurde der einfache Milz- und Serumextrakt (2 x G - 10, vgl. B 1), injiziert wurde für jede Blutbildkontrolle mindestens je 15 Tieren

- 0,1 ml 0,9% NaCl-Lösung
- 5 g Äq ME
- 10 ml Äq SE,

wobei jedem Tier nur einmal Blut abgenommen wurde. Die Blutabnahmen erfolgten jeweils 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Injektion. Alle Werte wurden innerhalb dieses e i n e n Versuches bestimmt, verglichen wurden alle Kollektive mit einem unbehandelten, zu einem anderen Zeitpunkt bestimmten Kollektiv.

C 2.1 Verhalten der Leukozytenzahl (Abb. 7 und Tab. 1)

- a nach NaCl: Nach 1 und 4 Stunden waren die NaCl-Werte der Leukozyten gegenüber den Unbehandelten signifikant erhöht. Sie fielen bis zur 24. Stunde ab (signifikant mit der Zeit korreliert), dann folgte ein unregelmäßiger Anstieg auf normale bis übernormale Werte.
- b nach ME: Schon nach 1 Stunde waren die Leukozyten gegen 0,9% NaCl hochsignifikant

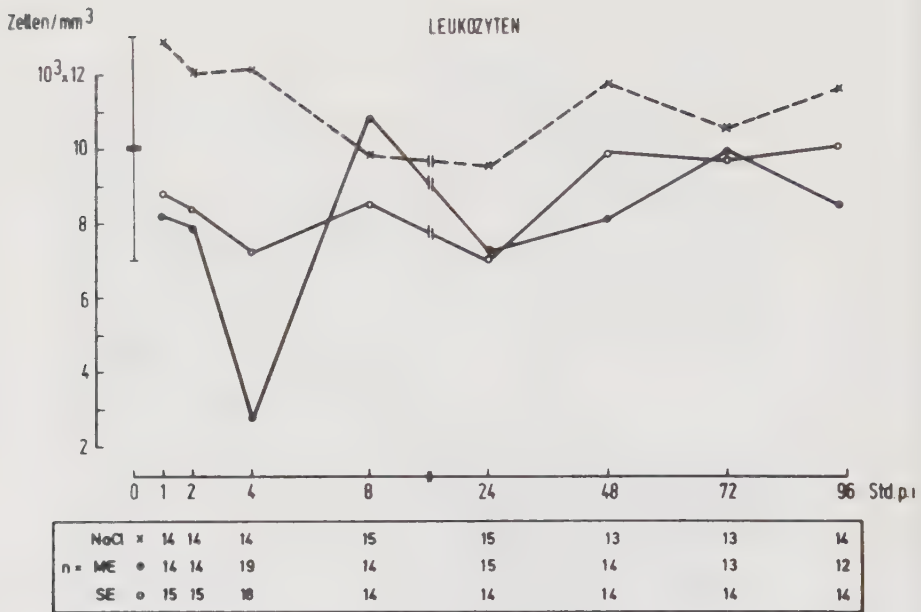


Abb. 7 : Zeitlicher Verlauf des Verhaltens der Leukozyten nach Injektion von NaCl (x---x), Milzextrakt (●—●) und Serumextrakt (o—o). Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kollektivs (n = 30) eingezeichnet.

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs.

erniedrigt; sie fielen dann über die 2. Stunde bis zur 4. kontinuierlich ab (die letzten beiden Werte auch gegen das unbehandelte Kollektiv signifikant erniedrigt). In der 8. Stunde war ein starker Anstieg zu verzeichnen; danach wieder eine gegen 0,9% NaCl und Unbehandelte signifikante Senkung in der 24. Stunde. Nach einem weiteren Anstieg (72. Stunde) brachte die 96. Stunde eine neuerliche gegen NaCl signifikante Erniedrigung - so daß die weitere Tendenz der Leukozytenzahlen nach ME unklar erscheint.

c nach SE: Das Verhalten der Leukozytenzahl nach SE glich einem abgeschwächten Verlauf nach ME. Die Senkung in der 8. Stunde war bei weitem nicht so stark wie nach ME, ab der 24. Stunde schien sich die Leukozytenzahl auf normale Werte einzuspielen.

d Vergleich: Milzextrakt und Serumextrakt senkten in der 1., 2., 4. und 24. Stunde die Leukozytenzahl gegen 0,9% NaCl signifikant - ME auch noch in der 48. und 96. Stunde. Die stärkere Leukopenie nach Milzextraktgabe ist von der nach Serumextraktgabe in der 4. und 48. Stunde signifikant zu trennen. Gegenüber den unbehandelten Tieren verhalten sich ME und SE ähnlich: die Leukozytenzahl ist signifikant erniedrigt in der 4. und 24. Stunde, bei ME auch noch in der 2. Stunde.

In der 8. Stunde sind sich alle 4 Kollektive am ähnlichsten, in der 4. Stunde sind die Unterschiede am größten.

Die Tendenz der drei Kollektive scheint nicht ganz sicher: die NaCl-Werte pendeln sich evtl. auf übernormale, die Werte nach Serumextrakt auf normale

und die Werte nach Milzextrakt auf subnormale Leukozytenzahlen ein.

Std. p.i.	1	2	4	8	24	48	72	96
ME / NaCl	↓	↓	↓	ns	↓	↓	ns	↓
ME / Unbeh.	ns	↓	↓	ns	↓	ns	ns	ns
SE / NaCl	↓	↓	↓	↓	↓	↓	ns	ns
SE / Unbeh.	ns	ns	↓	ns	↓	ns	ns	ns
ME / SE	ns	ns	↓	ns	ns	↓	ns	↓
NaCl / Unbeh.	↑	ns	↑	ns	ns	ns	ns	ns

Tab. 1: L e u k o z y t e n

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante

Senkung nach ME und SE gegenüber NaCl und Unbehandelte (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

C 2.2 Verhalten der Zahl der stabkernigen Granulozyten
(Abb. 8 und Tab. 2)

- a nach NaCl: Auf die Injektion von 0,9% NaCl folgte ein Anstieg der stabkernigen Granulozyten (bis zur 8. Stunde signifikant über den Werten des unbehandelten Kollektivs); dann sanken die Werte langsam ab und waren gegen die unbehandelten Tiere nicht mehr signifikant verändert.
- b nach ME: Nach anfänglichem Absinken der stabkernigen Granulozyten, die in der 2. Stunde deutlich unter denen nach 0,9% NaCl lagen, folgte bis zur 4. Stunde ein steiler Anstieg - signifikant gegen 0,9% NaCl und unbehandeltes Kollektiv. Dann trat eine kontinuierliche, mit der Zeit korrelierte Senkung auf normale bis unter-normale Werte ein.
- c nach SE: Die stabkernigen Granulozyten nach Serumextraktgabe machten keine auffälligen Verschiebungen durch; sie waren gegen die unbehandelten Tiere nie signifikant verändert, nur gegen 0,9% NaCl in der 2. und 8. Stunde erniedrigt.
- d Vergleich: Eine deutliche Vermehrung stabkerniger Zellen trat bei 0,9% NaCl in der 2., bei ME in der 4. Stunde auf. Die Stabkernigen nach Injektion von Milzextrakt waren in der 1., 4., 8. und 24. Stunde signifikant gegenüber den Werten nach Injektion von Serumextrakt erhöht. Alle Kollektive lagen ab der 24. Stunde wieder im Normbereich des unbehandelten Kollektivs. Nach Injektion von Milz-

extrakt waren ab der 24. Stunde die stabkernigen Granulozyten gegenüber 0,9% NaCl und dem unbehandelten Kollektiv (nicht signifikant) erniedrigt.

Std. p.i.	1	2	4	8	24	48	72	96
ME / NaCl	ns	↓	↑	↑	↑	ns	ns	ns
ME / Unbeh.	↑	ns	↑	↑	↑	ns	ns	ns
SE / NaCl	ns	↓	ns	↓	ns	ns	ns	ns
SE / Unbeh.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ME / SE	↑	ns	↑	↑	↑	ns	ns	ns
NaCl / Unbeh.	ns	↑	↑	↑	ns	ns	ns	ns

Tab. 2: S t a b k e r n i g e
 G r a n u l o c y t e n

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach ME und SE gegenüber NaCl und Unbehandelte (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

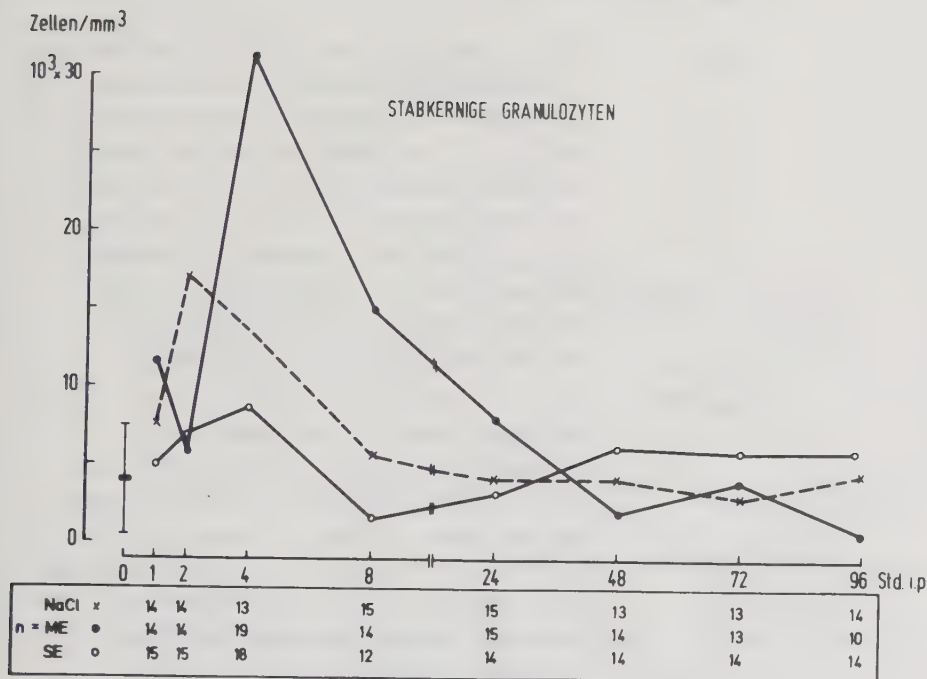
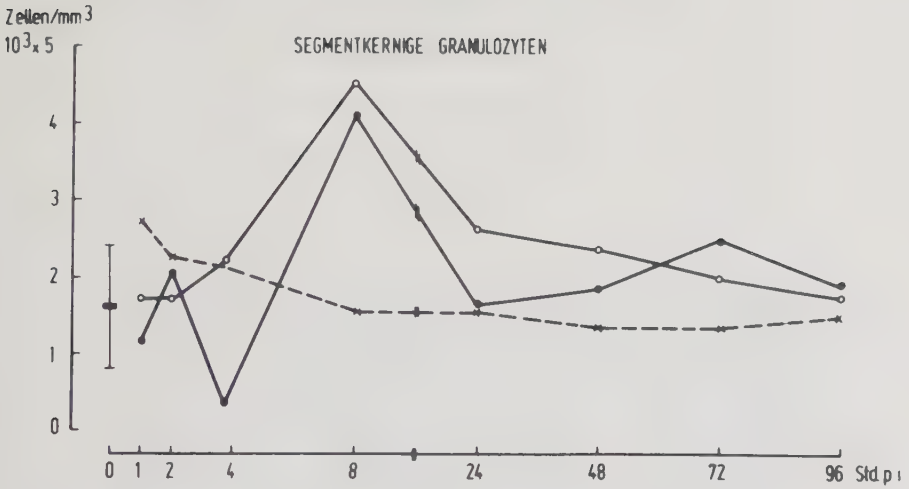


Abb. 8: Zeitlicher Verlauf des Verhaltens der Stabkernigen Granulozyten nach Injektion von NaCl (x---x), Milzextrakt (●—●) und Serumextrakt (○—○). Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kollektivs (n = 30) eingezeichnet. n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs.

C 2.3

Verhalten der Zahl der segmentkernigen Granulozyten (Abb. 9 und Tab. 3)

- a nach NaCl: Nach Injektion von 0,9% NaCl machten die segmentkernigen Granulozyten nur geringe zahlenmäßige Veränderungen durch; vom übernormalen und gegen das unbehandelte Kollektiv leicht signifikant erhöhten Wert der 1. Stunde fiel die Zellzahl langsam ab und war während der folgenden Kontrollen immer im Normbereich - vom unbehandelten Kollektiv nicht verschieden.
- b nach ME: In der 1. Stunde lagen die segmentkernigen Granulozyten nach ME signifikant niedriger als die nach 0,9% NaCl, aber im Normbereich der unbehandelten Tiere. In der 4. Stunde trat ein Abfall auf einen Wert signifikant unter Kochsalz und Normalkollektiv auf. Bis zur 8. Stunde stiegen dann die Segmentkernigen fast auf das Dreifache ihres Ausgangswertes an; nach 24 Stunden war diese Granulozytose nicht mehr nachweisbar. Ein leichterer Anstieg, noch signifikant gegen 0,9% NaCl und unbehandelte Tiere, erfolgte in der 72. Stunde. Nach 96 Stunden waren die Zellen wieder im Normbereich.
- c nach SE: Die Segmentkernigen nach Serumextraktgabe zeigten kein Absinken nach 4 Stunden - bewegten sich aber ansonsten in etwa auf der Kurve der Zellverschiebungen nach ME-Gabe.
- d Vergleich: Nur nach Milzextraktgabe trat in der 4. Stunde eine Granulozytopenie auf. Die Granulozy-



NaCl	x	14	14	13	15	15	13	13	14
n = ME	●	13	14	19	14	15	14	13	10
SE	o	15	15	16	14	14	14		

Abb. 9 : Zeitlicher Verlauf des Verhaltens der Segmentkernigen Granulozyten nach Injektion von NaCl (x---x), Milzextrakt (●—●) und Serumextrakt (o—o). Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kollektivs (n = 30) eingezeichnet. n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs.

tose nach 8 Stunden riefen sowohl die Milz- als auch die Serumextraktinjektionen hervor. Die geringsten Veränderungen zeigten die mit Kochsalz behandelten Tiere.

Stl. p. i.	1	2	4	8	24	48	72	96
ME / NaCl	↓	ns	↓	↑	ns	↑	↑	ns
ME / Unbeh.	ns	ns	↓	↑	ns	ns	↑	ns
SE / NaCl	ns	ns	ns	↑	↑	↑	ns	ns
SE / Unbeh.	ns	ns	ns	↑	↑	ns	rs	ns
ME / SE	ns	ns	↓	ns	↓	rs	ns	ns
NaCl / Unbeh.	↑	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tab. 3: Segmentkernige
Granulocyten

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach ME und SE gegenüber NaCl und Unbehandelte (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

C 2.4 Verhalten des Kernverschiebungsindex

(Abb. 10 und Tab. 4)

Der Kernverschiebungsindex (Verhältnis der Stabkernigen zu den Segmentkernigen) gibt einen Hinweis auf das Verhältnis von jugendlichen zu reifen Granulozyten. Unser Normalwert (unbehandeltes Kollektiv) lag bei 0,024, allerdings mit einem hohen Variationskoeffizienten.

- a nach NaCl: Bis zur 2. Stunde stieg der KI auf mehr als das Doppelte seines Ausgangswertes an. Dieser Anstieg entspricht der Vermehrung der stabkernigen Granulozyten (die Segmentkernigen fielen während dieser Zeit leicht ab). Das weitere Verhalten des KI entspricht sowohl dem Kurvenverlauf der Segmentkernigen als auch dem der Stabkernigen, d.h. ab der 8. Stunde machten weder die Gesamtgranulozyten eine stärkere Abweichung vom Normbereich durch, noch veränderte sich das Verhältnis der jugendlichen zu den reifen Zellen. Ab der 8. Stunde blieb der KI auch im Normalbereich des unbehandelten Kollektivs.
- b nach ME: Den hohen Werten der stabkernigen Granulozyten in der 1. und 4. Stunde entsprach jeweils ein hoher Wert des Kernverschiebungsindex (beide Werte signifikant gegen 0,9% NaCl und unbehandelte Tiere erhöht) - vor allem in der 4. Stunde, wo die Werte der Segmentkernigen besonders niedrig lagen. Zur Zeit der Granulozytose in der 8.

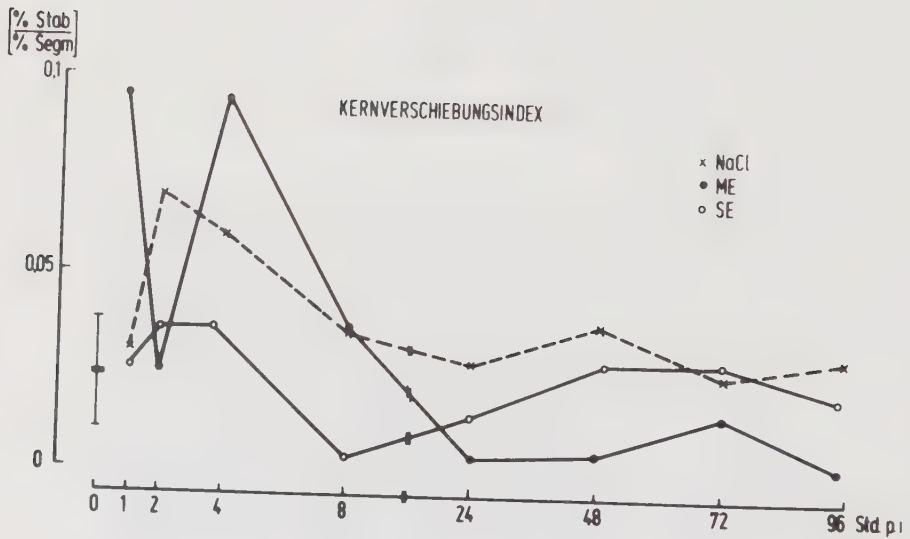


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf des Verhaltens des Kernverschiebungsindex nach Injektion von NaCl (x---x), Milzextrakt (•—•) und Serumextrakt (o—o). Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kollektivs (n = 30) eingezeichnet.

Stunde lag der Kernverschiebungsindex wieder bei niedrigen Werten. Er blieb auch niedrig während der Normalisierung der Granulozytenwerte in den folgenden Stunden, d.h. ab der 8. Stunde traten jugendliche Granulozyten nicht vermehrt im peripheren Blut auf. In der 96. Stunde war der Kernverschiebungsindex nach ME signifikant erniedrigt.

c nach SE: Der Kernverschiebungsindex nach SE zeigt nur Schwankungen um den Normalbereich. Er geht ziemlich parallel mit dem Verhalten der stabkernigen Granulozyten. Wesentliche Verschiebungen innerhalb der Granulozyten lassen sich aus ihm nicht erkennen.

d Vergleich: Das Verhalten des Kernverschiebungsindex spiegelte die wechselnden Beziehungen innerhalb der Granulozyten wider: Die Granulozytenpenie in der 4. Stunde bei ansteigenden Stabkernigen nach Milzextrakt brachte einen Anstieg des KI, d.h. die Granulozytopenie wurde allein durch einen massiven Abfall der Segmentkernigen bewirkt. Die Granulozytose nach ME und SE in der 8. Stunde wurde nur beim Milzextrakt auch von den Stabkernigen mitgetragen, beim Serumextrakt lag der Kernverschiebungsindex eher tief. Ab der 24. Stunde zeigte auch der Kernverschiebungsindex die Normalisierung innerhalb der Granulozyten, wobei die Werte nach Milz- und Serumextraktgabe zum Teil etwas unter der Norm lagen. In der 96. Stunde lag der Kernverschiebungsindex nach Milzextraktgabe signifikant unter dem Wert nach 0,9% NaCl, des unbehandelten Kollektivs sowie bei Serumextraktgabe - ein Hinweis auf verminderte Granulozytenproliferation unter längerdauernder Milzextrakteinwirkung.

Std. p.i.	1	2	4	8	24	48	72	96
ME / NaCl	↑	↓	↑	ns	↓	↓	ns	↓
ME / Unbeh.	↑	ns	↑	ns	↓	↓	ns	↓
SE / NaCl	ns	↓	↓	↓	ns	ns	ns	ns
SE / Unbeh.	ns	ns	ns	↓	ns	ns	rs	ns
ME / SE	↑	ns	↑	↑	ns	↓	rs	↓
NaCl / Unbeh.	ns	↑	↑	ns	ns	ns	ns	ns

Tab. 4: Kernverschiebungs-
index

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach ME und SE gegenüber NaCl und Unbehandelte (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

U 2.5

Verhalten der Lymphozytenzahl (Abb. 11 und Tab. 5)

- a nach NaCl: Während aller Kontrollen bewegten sich die Lymphozyten nach NaCl-Injektion im oberen Normbereich; sie waren vom unbehandelten Kollektiv zu keiner Zeit statistisch signifikant zu trennen.
- b nach ME: Vom 72-Stunden-Wert abgesehen, waren sonst bei allen Kontrollen die Lymphozyten nach Milzextraktinjektion signifikant gegenüber denen nach 0,9% NaCl erniedrigt. Die stärkste Lymphopenie (die mit der stärksten Leukozytopenie zusammenfiel) trat nach 4 Stunden auf. In der 2., 4. und 8. Stunde war der Abfall der Lymphozytenzahl auch verglichen mit dem unbehandelten Kollektiv signifikant. Der allmähliche Anstieg der Lymphozyten ab der 8. Stunde führte zu einer Normalisierung der Zellzahlen (im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, gegen 0,9% NaCl aber immer noch signifikant erniedrigt), in der 96. Stunde deutete sich ein nochmaliges Absinken der Zellzahlen an.
- c nach SE: Das Maximum der Lymphopenie nach Serumextraktgabe kam später (8.Stunde) und nicht so ausgeprägt wie nach ME. Deshalb erfolgte auch der Anstieg in den Normalbereich erst später (ab der 24. Stunde). Ansonsten ist das Verhalten der Lymphozyten dem nach ME auffallend ähnlich.
- d Vergleich: Die Lymphozytenzahl nach 0,9% NaCl läßt keine sicheren Zellveränderungen erkennen. Nach ME und SE findet sich eine langandauernde, sehr deut-

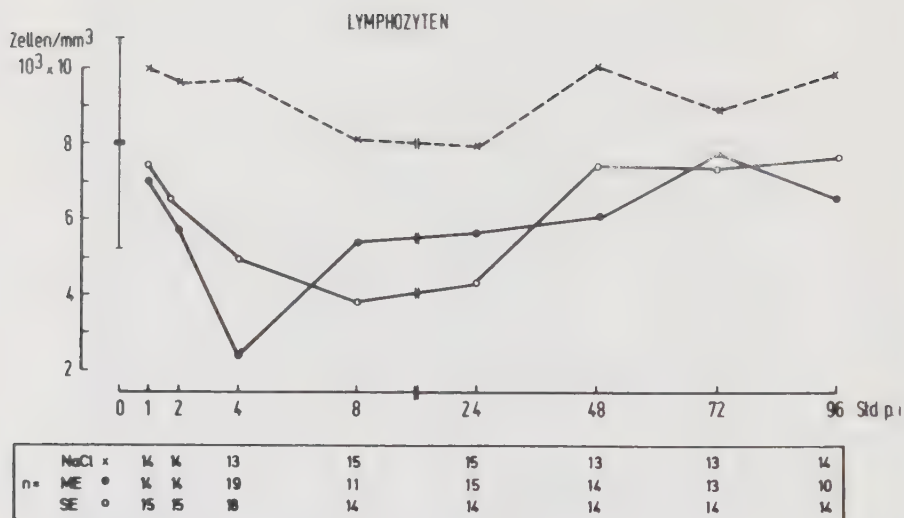


Abb. 11 : Zeitlicher Verlauf des Verhaltens der L y m p h o z y t e n nach Injektion von NaCl (x---x), Milzextrakt (●—●) und Serumextrakt (o—o). Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kollektivs (n = 30) eingezeichnet.

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs.

liche Lymphopenie - nach ME stärker als nach SE.

e Stresslymphozyten: Ab der 24. Stunde fanden sich in den Ausstrichen nach Milz- und Serumextraktinjektion (bei 0,9% NaCl weniger) vermehrt große Lymphozyten (gegen Monozyten z.T. schwer abgrenzbar). Sie können als sog. "Stresslymphozyten" charakterisiert werden, die unter Belastung vermehrt auftreten (DOUGHERTY 35).

Std. p.i.	1	2	4	8	24	48	72	96
ME / NaCl	↓	↓	↓	↓	↓	↓	ns	↓
ME / Unbeh.	ns	↓	↓	↓	ns	ns	ns	ns
SE / NaCl	↓	↓	↓	↓	↓	↓	ns	ns
SE / Unbeh.	ns	ns	↓	↓	↓	ns	ns	ns
ME / SE	ns	ns	↓	↑	ns	ns	ns	ns
NaCl / Unbeh.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tab. 5 : L y m p h o z y t e n

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach ME und SE gegenüber NaCl und Unbehandelte (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

C 2.6 Verhalten der Zahl der eosinophilen Granulozyten

Wegen der geringen Zellzahlen der eosinophilen Granulozyten sind statistisch eindeutig abzusichernde Aussagen über ihr Verhalten nach den verschiedenen Injektionen nicht möglich. Die Werte nach Injektion von 0,9% NaCl schienen zu keinem Zeitpunkt von denen des unbehandelten Kollektivs wesentlich abzuweichen. Nach Milz- und Serumextraktinjektion folgte einer leichten Senkung in den ersten 8 Stunden ein Anstieg auf hochnormale Werte. Von einer statistisch zu sichernden Eosinophilie konnte aber zu keinem Zeitpunkt gesprochen werden.

C 2.7 Verhalten der Zahl der Monozyten (Abb. 12 und Tab. 6)

- a nach NaCl: Die Monozyten nach Injektion von 0,9% NaCl bewegten sich immer im Normalbereich des unbehandelten Kollektivs. Aus den sonst tief normalen Zellzahlen erfolgte nur in der 4. Stunde ein Anstieg auf einen mittelnormalen Wert.
- b nach ME: Nach Injektion von Milzextrakt befanden sich die Monozyten mit leichten Schwankungen bis zur 8. Stunde im unteren Normbereich. Dann stiegen sie - mit der Zeit korreliert - bis zur 72. Stunde auf das 6-fache ihrer Ausgangszellzahl an (signifikant gegen 0,9% NaCl und unbehandelte Tiere). In der 96. Stunde sanken sie wieder auf Werte im oberen Normbereich ab.

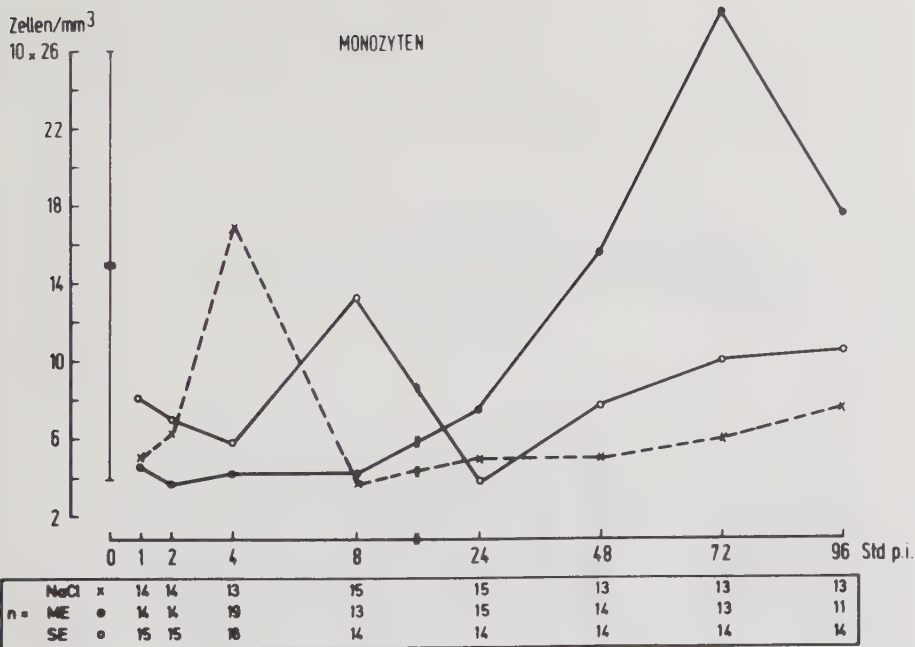


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf des Verhaltens der Monozyten nach Injektion von NaCl (x---x), Milzextrakt (●—●) und Serumextrakt (o—o). Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kollektivs (n = 30) eingezeichnet.

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs.

c nach SE: Die Monozyten nach SE schwankten innerhalb des Normalbereiches. In der 8. Stunde lagen sie gegen 0,9% NaCl und ME signifikant erhöht im Normalbereich. Den steilen Anstieg nach ME ab der 8. Stunde machten sie nicht mit.

d Vergleich: Die Monozytenzahlen bei 0,9% NaCl und Serumextrakt schwanken im Normalbereich. Eine signifikante Veränderung ist ein kontinuierlicher Anstieg nach ME ab der 8. Stunde.

Std. p.i.	1	2	4	8	24	48	72	96
ME / NaCl	ns	ns	↓	ns	ns	↑	↑	↑
ME / Unbeh.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	↑	ns
SE / NaCl	ns	ns	↓	↑	ns	ns	ns	ns
SE / Unbeh.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ME / SE	ns	↓	ns	↓	ns	↑	↑	↑
NaCl / Unbeh.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tab. 6: M o n o z y t e n

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante

Senkung nach ME und SE gegenüber NaCl und Unbehandelte (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

1.2 Kurzzeitversuche

Verschieden hergestellte und fraktionierte Extrakte von Milz und Serum wurden in "Kurzzeitversuchen", d. h. 6 - 8 Stunden nach Injektion auf ihre Wirksamkeit geprüft.

C 3.1 Fraktionierter Milz- und Serumextrakt nach G - 25

C 3.1.1 Säulenlauf und Fraktionierung

Nach Präparation von Milz- und Serumextrakten entsprechend "Einfachen Extrakten" (B 1) wurde ein Trennprozeß mit G - 25 angeschlossen; dieser ergab bei beiden Extrakten eine differenzierte photo-metrische Auftrennung (Serum: Abb. 13; Milz: Abb. 14), so daß das Eluatvolumen entsprechend den Extinktionsbanden in annähernd gleich große Fraktionen eingeteilt werden konnte. Fraktion 1 wurde so gewählt, daß sie das Ausschlußvolumen enthielt (Serum: Tab. 7; Milz: Tab. 8).

Alle Fraktionen wurden nach Lyophilisation an je 20 Tieren getestet. Je Tier wurden 20 ml Äq Serum- bzw. 10 mg Äq Milzextrakt injiziert, die Blutabnahme erfolgte nach 4 Stunden.

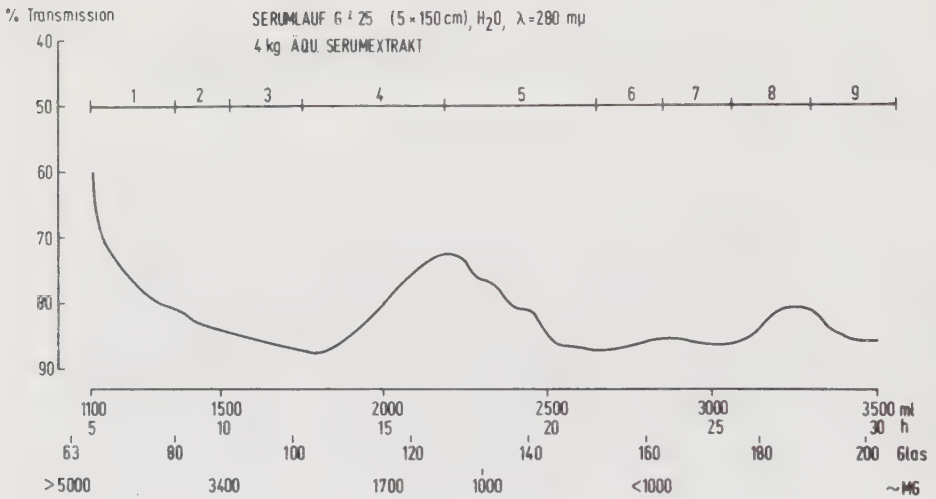


Abb. 13 : Transmissionskurve von

Serumlauf G - 25

(5 x 150 cm; 102 ml/h; Trennmedium H₂O; $\lambda = 280 \text{ m}\mu$;
umlaufende Kühlung)

Aufteilung in 9 Fraktionen

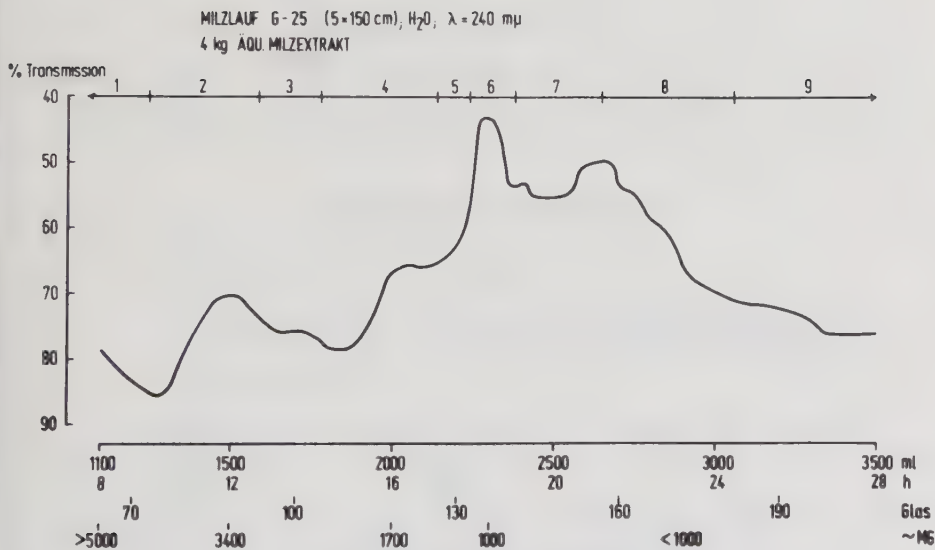


Abb. 14: Transmissionskurve von

Milzlauf G-25

(5 x 150 cm; 102 ml/h; Trennmedium H₂O; $\lambda = 240 \text{ m}\mu$;

umlaufende Kühlung)

Aufteilung in 9 Fraktionen

				ml	MG
F ₁	=	Glas	63 - 80	= 1071 - 1360	> 5 000 (Ausschluß)
F ₂	=	"	81 - 90	= 1360 - 1530	3 500 - 4 500
F ₃	=	"	91 - 103	= 1530 - 1751	2 500 - 3 500
F ₄	=	"	104 - 120	= 1751 - 2193	1 300 - 2 500
F ₅	=	"	130 - 156	= 2193 - 2652	1 000 - 1 300
F ₆	=	"	157 - 168	= 2652 - 2856	} 700 - 1 000
F ₇	=	"	169 - 180	= 2856 - 3060	
F ₈	=	"	181 - 195	= 3060 - 3315	
F ₉	=	"	196 - 210	= 3315 - 3490	

Tab. 7: Fraktionierung bei Serum, G - 25

Mit Angabe des ungefähren Molekulargewichts
(vgl. Eichkurve G - 25, Abb. 4)

				ml	MG
F ₁	=	Glas	60 - 74	= 1020 - 1258	> 5 000 (Ausschluß)
F ₂	=	"	75 - 94	= 1258 - 1598	3 500 - 5 000
F ₃	=	"	95 - 105	= 1598 - 1785	2 300 - 3 500
F ₄	=	"	106 - 126	= 1785 - 2142	1 400 - 2 300
F ₅	=	"	127 - 132	= 2142 - 2244	1 100 - 1 400
F ₆	=	"	133 - 140	= 2244 - 2380	900 - 1 100
F ₇	=	"	141 - 156	= 2380 - 2652	} 700 - 900
F ₈	=	"	157 - 180	= 2652 - 3060	
F ₉	=	"	181 - 222	= 3060 - 3774	

Tab. 8: Fraktionierung bei Milz, G - 25

Mit Angabe des ungefähren Molekulargewichts
(vgl. Eichkurve G - 25, Abb. 4)

Fraktionen	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ME / NaCl	↓	ns	ns	ns	↓	↓	ns	ns	ns
SE / NaCl	ns	ns	ns	ns	↓	↓	ns	ns	ns
ME / SE	ns	ns	ns	ns	↑	ns	ns	ns	ns
ME / Unbeh.	ns	↓	ns	↓	↓	↓	↓	ns	ns
SE / Unbeh.	ns	↓	ns	ns	↓	↓	↓	↓	ns

Tab. 9: L e u k o z y t e n

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung
nach den 9 Serum- bzw. Milzfraktionen gegenüber NaCl
und Unbehandelten

(Zweiseitige Fragestellung, 5 % Niveau, ns = nicht
signifikant)

C 3.1.2 Vergleich der Milz- und Serumfraktionen

Die biologische Testung ergab beim Serumextrakt:

Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren fielen
die Gesamtleukozytenzahlen der meisten Fraktionen ab.
Verglichen mit 0,9% NaCl zeigten zwar mehrere Frak-
tionen eine Leukozytendepression, signifikant ernie-
drigt war jedoch nur Fraktion 5 und 6 (ein Wirkungs-
gipfel, MG 900 - 1100).

Die biologische Testung ergab bei Milzextrakt:

Die Ergebnisse waren ähnlich beim Vergleich mit
dem unbehandelten Kollektiv; verglichen mit 0,9%
NaCl wurden die Gesamtleukozytenzahlen der Fraktio-
nen 1, 5 und 6 signifikant gesenkt: Hinweis auf eine
Aktivität des Milzextraktes im höher- und niedermo-

lekularen Bereich (2 Wirkungsgipfel).

Die Verschiebungen im Differentialblutbild waren gering; die Lymphozyten zeigten eine leichte nicht signifikante Depression bei beiden Extrakten, die Granulozyten eine mäßige Erhöhung. Insgesamt waren die Ergebnisse viel weniger deutlich als beim Vollmilzextrakt (Reduktion der Aktivität evtl. durch allzu starke Fraktionierung).

Damit zeigt dieser Versuch auch, daß durchaus nicht alle Milzextrakte unspezifisch die Leukozytenzahl und das Differentialblutbild beeinflussen; die Blutbildveränderungen beschränken sich auf einzelne, definierte Extraktfraktionen, die sich durch ihren Molekulargewichtsbereich unterscheiden. Die übrigen, unwirksamen Extrakte unterscheiden sich in ihrer Wirkung in keiner Weise von einer NaCl-Injektion.

C 3.2

Milzextrakt nach G - 50 und G - 25 (vgl. S. 166 f.)

Nach 2 x G - 10 wurde bei diesem Extrakt zur besseren Reinigung ein Lauf mit Sephadex G - 50 (5 x 60 cm) mit Verwerfen des Ausschlußvolumens durchgeführt; anschließend wurde von G - 25 (2,5 x 90 cm) das Ausschlußvolumen gesammelt (höhermolekulare Substanzen, Molekulargewicht 5 000 - 20 000) und biologisch getestet. Dieses Ausschlußvolumen hatte als Fraktion 1 von C 3.1 schon eine Wirkung gezeigt.

Es ergab sich (Tab. 10): die Ergebnisse des einfachen Milzextraktes (F 1, C 3.1) bestätigten sich; die Wirkungsgleichheit bezog sich sowohl auf die Gesamtleukozytenzahl als auch auf das Differentialblutbild. Dies zeigt, daß auch im höhermolekularen

	Leuko	EO	STAB	SEGM	LYMPH	MONO
ME / NaCl	↓	ns	↑	ns	↓	↑
ME / Unbeh.	↓	↓	↑	ns	↓	↓
NaCl / Unbeh.	ns	↓	ns	ns	ns	ns

Tab. 10: Leukozyten und Differentialblutbild

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach 5 g Äq ME (2 x G - 10, 1 x G - 50, 1 x G - 25) gegenüber 0,9% NaCl und Unbehandelten. (Zweiseitige Fragestellung, 5 % Niveau, ns = nicht signifikant)

Bereich Milzextrakt-Wirkungen vorhanden sind. Der Abfall der Lymphozyten gegenüber NaCl ($\sim 50\%$) und der Gesamtleukozyten ($\sim 25\%$) sowie der Anstieg der stabkernigen Granulozyten ($\sim 55\%$, evtl. verstärkte Reizeffekte durch höhermolekulare Partikel) waren wesentlich stärker ausgeprägt als bei der vergleichbaren Fraktion 1 von C 3.1, wo durch die Fraktionierung die Aktivität aufgespalten wurde.

C 3.3 Milz- und Serumextrakt nach G - 25 und 2 x G 50,
fraktioniert

C 3.3.1 Fraktionierung nach G - 50 (Abb. 15 und 16)

In einem weiteren Versuch wurde der unter C 3.2 gewonnene Extrakt (MG $\sim$ 5000 - 20 000) in einem anschließenden G - 50 - Lauf (2,5 x 90 cm) fraktioniert (höhermolekulare Fraktionen).

Gesammelt und biologisch getestet wurden jeweils die Fraktionen III und IV (MG_{Fraktion III} > MG_{Fraktion IV}, angenähert Fraktion III MG 6000 - 8 500, Fraktion IV MG 5000 - 6000). Da infolge der weitergehenden Fraktionierung eine Verminderung der biologischen Wirksamkeit erwartet werden mußte, wurden bei der Testung jeweils 10 g bzw. 10 ml Äq/Tier injiziert.

C 3.3.2 Vergleich der Milz- und Serumfraktionen (Tab. 11)

Eine signifikante leukodepressive Wirkung ergab sowohl bei der Milz als auch beim Serum Fraktion III, bei Milzextrakt stärker ausgeprägt als nach Serumextraktgabe (20 % mehr). Fraktion IV zeigte bei Serum und Milz eine nicht signifikante Senkung der Gesamtleukozytenzahl.

Interessant ist die Entwicklung im Differentialblutbild: Fraktion III von Milz und Serum bestätigte die Wirkung der "Einfachen Extrakte"; das bedeutet, daß durch die weitergehende Fraktionierung die Wirksamkeit der Extrakte sich in diesem Bereich nicht verändert. Die hinsichtlich der Gesamtleukozytenzahl unwirksame Fraktion IV von Milz und Serum zeigte im

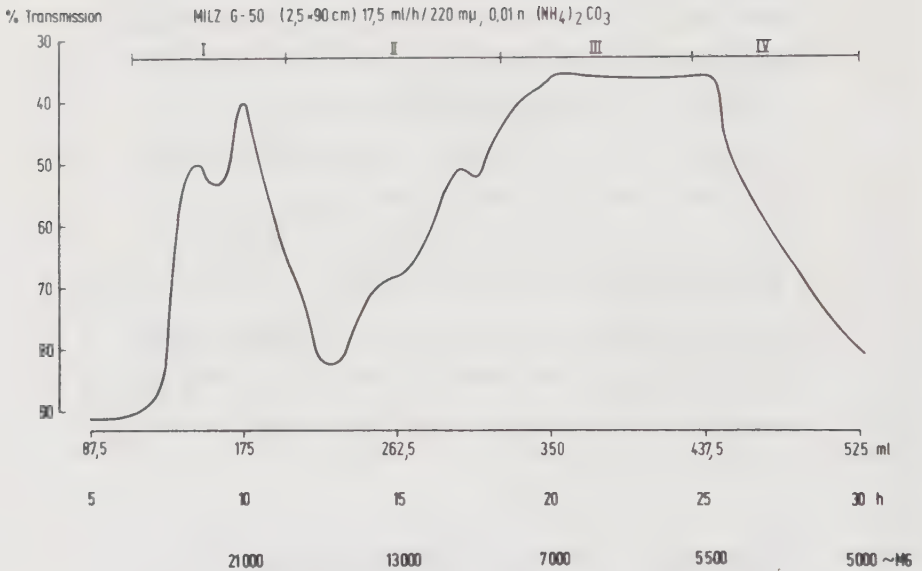


Abb. 15: Transmissionskurve von

MILZ G-50

(2,5 x 90 cm, 17,5 ml/h, 2,91 ml/Glas; Trennmedium $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; $\lambda = 220 \text{ m}\mu$; umlaufende Kühlung).

Aufteilung in 4 fraktionen

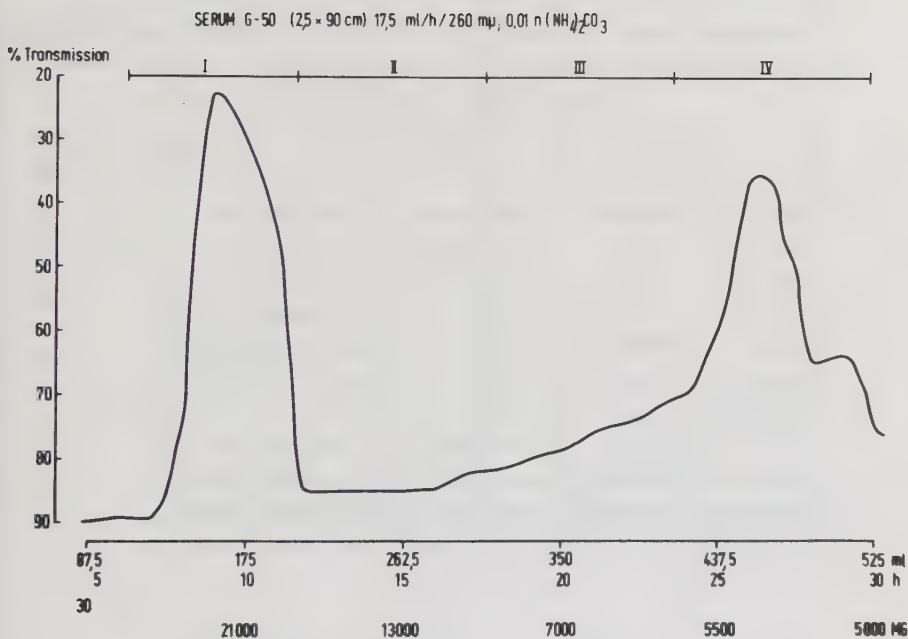


Abb. 16: Transmissionskurve von

Serum G - 50

(2,5 x 90 cm, 17,5 ml/h, 2,91 ml/Glas; Trennmedium

0,01 n $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; $\lambda = 260 \text{ m}\mu$; umlaufende Kühlung)

Aufteilung in 4 Fraktionen

	LEUKO	EO	STAB	SEGM	LYMPH	MONO
ME III / NaCl	↓	ns	↑	ns	↓	ns
ME IV / NaCl	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SE III / NaCl	↓	ns	↑	↓	↓	↑
SE IV / NaCl	ns	ns	ns	ns	↓	ns
ME III / Unbeh.	↓	ns	↑	ns	↓	↓
ME IV / Unbeh.	ns	ns	ns	ns	↓	↓
SE III / Unbeh.	↓	-	↑	↑	↓	ns
SE IV / Unbeh.	↓	-	ns	ns	↓	↓
ME III / SE III	ns	-	ns	↓	ns	ns
ME III / ME IV	↓	ns	↑	↓	↓	ns
SE III / SE IV	ns	-	↑	ns	ns	↑

Tab. 11: Leukozyten und Differentialblutbild

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung
nach Fraktion III und IV von 10 g Äq/Tier Milz- und
10 ml Äq/Tier Serumextrakt (2 x G - 50, 1 x G - 25)
gegenüber 0,9% NaCl und Unbehandelten.
(Zweiseitige Fragestellung, 5 % Niveau, ns = nicht
signifikant)

Differentialblutbild durchaus von 0,9% NaCl und dem
unbehandelten Kollektiv signifikant zu trennende
Wirkungen: die Lymphozyten fielen bei SE IV gegen
0,9% NaCl und Unbehandelte signifikant ab, der An-
stieg der stabkernigen und segmentkernigen Granu-

lozyten war bei diesen Fraktionen zwar nachweisbar, aber weder gegen 0,9% NaCl noch Unbehandelte signifikant. Diese Verschiebungen innerhalb des Differentialblutbildes entsprechen der Wirkung der aktiven Extrakte III hinsichtlich der Lymphopenie, d.h. ein bezüglich der Gesamtleukozytenzahl nicht wirksamer Extrakt kann durchaus noch signifikante Veränderungen im Differentialblutbild hervorrufen.

Die Darstellung des Ausmaßes der Zellverschiebungen im Differentialblutbild anhand der absoluten Zellzahlen bringt Abb. 17: dabei fällt auf, daß die hinsichtlich der Leukopenie unwirksame Serumfraktion IV die Lymphozyten ähnlich stark senkt wie die leukopenisierenden Extrakte ME III und SE III. (Durch den Anstieg der Segmentkernigen tritt aber nur eine leichte Leukopenie auf). Die Fraktion ME III hebt die Stabkernigen und senkt die Segmentkernigen, die Leukopenie geht dabei überwiegend auf Kosten der Lymphozyten. SE III hebt die Zahl der stabkernigen und der segmentkernigen Granulozyten, die Senkung der Lymphozyten ist aber so stark, daß noch eine signifikante Leukopenie resultiert.

C 3.3.3 Kernverschiebungsindex

Das Verhalten des Kernverschiebungsindex der einzelnen Fraktionen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren und zu 0,9% NaCl zeigt Abb. 18: Der Anstieg der Granulozyten, den in unterschiedlichem Maße alle Fraktionen bewirkten, war bei den Fraktionen III vor allem von den stabkernigen Granulozyten getragen. Die Granulozytose nach Extraktgabe war bei diesen Fraktionen mit einem starken Anstieg des Kernverschiebungsindex begleitet, d.h. die Zahl jugendlicher Zellen im peripheren Blut nahm stark zu (Linksverschiebung; entspricht dem unter C 2 als Kurzzeiteffekt festgestellten Verhalten der stabkernigen Granulozyten).

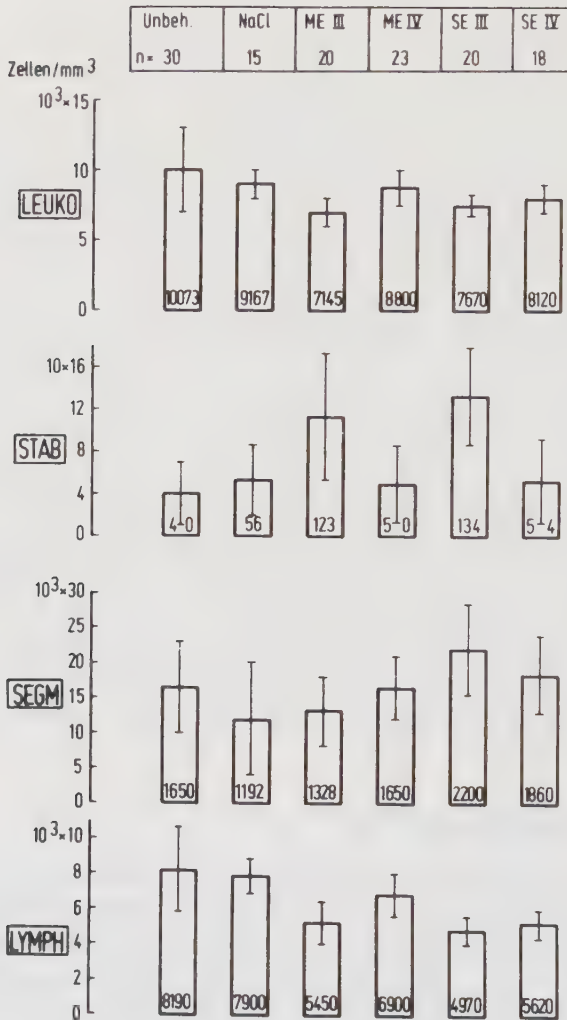


Abb. 17 : Absolute Zahlen von Leukozyten, stabkernigen und segmentkernigen Granulozyten sowie der Lymphozyten nach Fraktion III und IV von ME und SE (2 x G - 50, 1 x G - 25) verglichen mit NaCl und Unbehandelter.

(Mittelwerte mit Angabe der Standardabweichung, n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs)

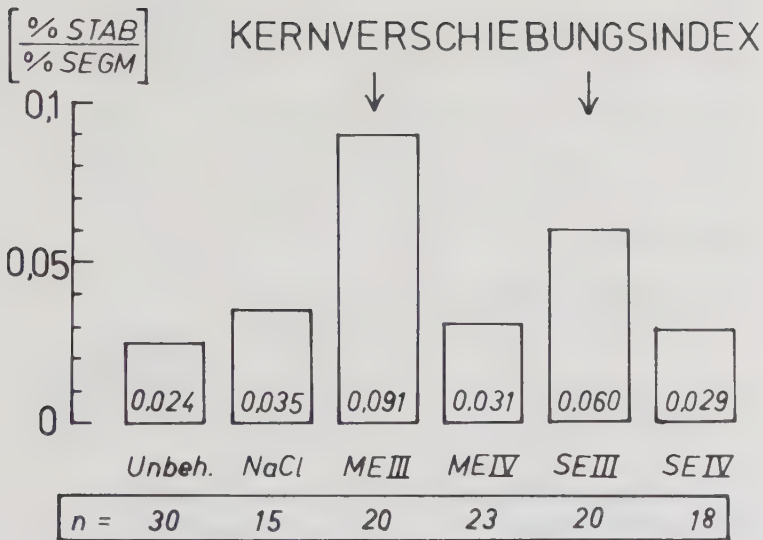


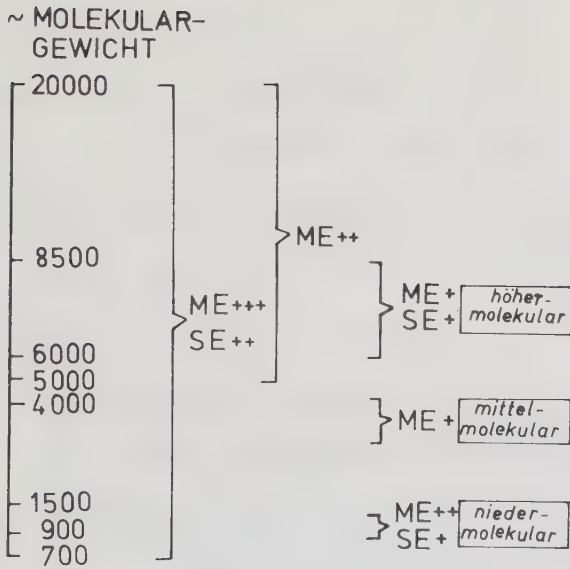
Abb. 18: Verhalten des Kernverschiebungsindex Unter dem Einfluß der Milz- und Serumfraktionen III und IV nach G - 25 und 2 x G - 50. Vergleich mit NaCl und Unbehandelten. Die mit ↓ markierten Werte sind sowohl von den Unbehandelten als auch von NaCl statistisch signifikant verschieden.
n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs

C 3.4 Vergleich

Die Versuche unter C 2 hatten die Wirksamkeit von Milz- und Serumextrakten mit einer ungefähren Molekulargewichtsbreite von $\sim 1000 - 20\,000$ gezeigt. Eine nähere Aufschlüsselung der wirksamen Molekulargewichtsbereiche sollten die kurzzeitversuche unter C 3 bringen. Vergleicht man diese Versuche (Abb. 19), so lassen sich drei wirksame Bereiche feststellen:

- 1) ein höhermolekularer Bereich (6 000 - 8 500)
Effektiv ist hier der Milz- und Serumextrakt (C 3.3, Fraktion III). Zwischen MG 5 000 - 6 000 noch ein Unterbereich mit ganz schwacher Wirkung (C 3.3, F IV)
- 2) ein mittelmolekularer Bereich ($\sim 4\,000$)
Effektiv ist nur der Milzextrakt (C 3.1, D 2)
- 3) ein niedermolekularer Bereich ($\sim 1\,000$)
Effektiv ist hier der Milz- und Serumextrakt (C 3.1, D 2)

Dazwischenliegende Fraktionen zeigten sich als unwirksam: sie veränderten das Differentialblutbild nicht und ließen sich von den NaCl-Kontrollgruppen nicht unterscheiden. Die Milz- und Serumextraktwirkung ist also auf bestimmte Molekulargewichtsbereiche beschränkt - werden alle drei Bereiche zusammengefaßt (C 2 und später C 4.1, C 4.2, C 4.3, D 1), so ergibt sich die stärkste Wirkung.



FRAKTIONIERUNGEN

Abb. 19: Schrittweise Unterfraktionierung
mit Angabe der Wirksamkeit (+) der Extrakte

C 4

Langzeitversuche

In den vorher beschriebenen "Kurzzeitversuchen" betrug die Latenzzeit zwischen Extraktinjektion und Blutabnahme jeweils 6 bzw. 8 Stunden, wobei ein Tier auch immer nur einmal gespritzt wurde. In den nun folgenden "Langzeitversuchen" sollte untersucht werden, inwieweit sich die Ergebnisse der Kurzzeitversuche durch wiederholtes Injizieren längere Zeit aufrechterhalten lassen, ob evtl. neue Effekte ("Langzeiteffekte") auftreten und welche Beziehungen über längere Zeit zwischen verschiedenen hohen Dosierungen der Extrakte bestehen (Anzahl der Injektionen, Höhe der Einzeldosis). Vorausgegangen waren die Versuche unter C 2, wo die Auswirkungen einer einmaligen Injektion von einfachem Milz- und Serumextrakt über 96 Stunden untersucht worden waren.

C 4.1

6 - Tage - Versuch mit Milzextrakt, Urbason und ACTH

Mögliche Parallelen in den Wirkungen von ACTH und Cortison (Urbason; Stressreaktion mit Lymphozytenabfall) mit denen des Milzextraktes wurden in einem 6-Tage-Versuch geprüft. Je 20 Tieren wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils um die gleiche Zeit injiziert:

- Milzextrakt nach 2 x G - 10 und 2 Dialysen
(2. Dialyse zur besseren Abtrennung höhermolekularer Verbindungen; 5 g Äq/Tier)
- 0,9% NaCl (0,1 ml/Tier)
- Urbason (50 γ /Tier)
- ACTH (2,5 γ /Tier)

Die Blutabnahme erfolgte am 6. Tag (18 Stunden nach der letzten Injektion).

In einem Vorausversuch war der Kurzzeiteffekt des Milzextraktes untersucht worden; dabei zeigte sich, daß mit der zweiten Dialyse hinsichtlich der Leukopenie eine erhebliche Wirkungseinbuße eintrat (die typischen Kurzzeitveränderungen im Differentialblutbild waren aber feststellbar). Deshalb macht dieser Extrakt die Unterschiede zum ACTH und Cortison auch nur bedingt deutlich.

Im einzelnen ergab sich (Tab. 12):

- Die Gesamtleukozytenzahl war nach Gabe von Milzextrakt, ACTH und Urbason sowohl gegen 0,9% NaCl als auch gegen das unbehandelte Kollektiv signifikant erniedrigt. Die Leukopenie durch Urbason war die stärkste (19 % gegen NaCl), durch Milzextrakt die schwächste (8 % gegen NaCl).
- Die Eosinophilen waren bei Urbason gegen NaCl und Unbehandelte signifikant erhöht, bei ACTH (signifikant niedriger als bei Urbason) noch gegen 0,9% NaCl signifikant vermehrt. Der Milzextrakt brachte keine feststellbare Zunahme der eosinophilen Granulozyten.
- Eine Verminderung der Lymphozyten resultierte nur bei ME signifikant gegen die unbehandelten Tiere und gegen 0,9% NaCl. Die Lymphopenie war am stärksten bei Milzextrakt (16 %), am schwächsten nach Urbason (4 % jeweils gegen 0,9% NaCl).
- Die Monozyten fielen bei allen Extrakten nur gegen das unbehandelte Kollektiv signifikant ab.

	LEUKO	EO	STAB	SEG	LYMPH	MONO
ME / NaCl	↓	-	↑	↓	↓	ns
ACTH / NaCl	↓	ns	ns	ns	rs	ns
Urb / NaCl	↓	↑	ns	ns	ns	rs
ME / Unbeh.	↓	-	↑	↓	↓	↓
ACTH / Unbeh.	↓	ns	↑	↓	ns	↓
Urb / Unbeh.	↓	↑	ns	↓	rs	↓
NaCl / Unbeh.	ns	-	ns	ns	ns	ns
ME / ACTH	ns	↓	ns	ns	↓	rs
ME / Urb	ns	-	rs	ns	↓	ns
ACTH / Urb	ns	↓	ns	rs	rs	ns

Tab. 12: Leukozyten und

Differentialblutbild

nach je 5 Injektionen von 5 g Äg/Tier ME, 2,5 µg/Tier Urbason, 50 µg/Tier ACTH sowie 0,9% NaCl.

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung gegenüber NaCl und Unbehandelte (zweiseitige Fragestellung; 5 % Niveau, ns = nicht signifikant)

Die Ergebnisse nach Milzextrakt (der infolge der 2. Dialyse in der Aktivität allerdings eingeschränkt war) unterscheiden sich von einer Nebennierenrinden-hormon-induzierten Veränderung des Differentialblut-bildes also vor allem durch:

- 1) Nach 5 Injektionen von Milzextrakt blieb ein Anstieg der Eosinophilen aus
- 2) Nur bei Milzextrakt stieg die Zahl der stab-kernigen Granulozyten signifikant an
- 3) Die Lymphopenie war beim Milzextrakt (bei re-lativ geringer Leukopenie) noch viel stärker als bei ACTH und Urbason

Der Kernverschiebungsindex (Abb. 20) bestätigt die Vermehrung jugendlicher Zellen nach Milzextrakt-gabe; er ist gegen alle anderen Kollektive signifi-kant erhöht. Es zeigt sich aber auch, daß ACTH - Gaben den Kernverschiebungsindex stark erhöhen.

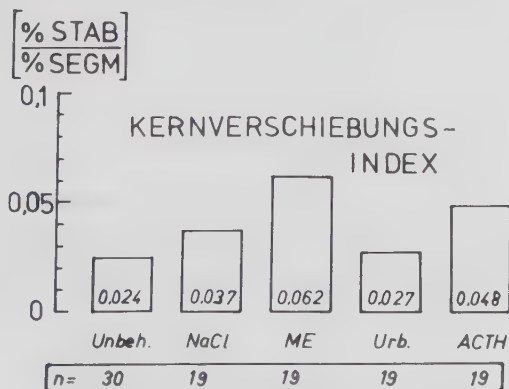


Abb. 20: K e r n v e r s c h i e b u n g s i n d e x nach je 5 Injektionen von 5 g Äq/Tier ME, 2,5 µ/Tier Urbason, 50 µ/Tier ACTH sowie 0,9% NaCl.

U 4.2

Blutbild nach einmaliger und wiederholter Injektion von Milzextrakt

Einen Hinweis auf Dosis - Wirkungsbeziehungen nach Milzextraktgabe sollte der folgende Versuch bringen: Es wurden Tiere, die 2, 3 und 4 mal Extrakt erhielten, mit nur einmal behandelten Tieren verglichen. Der Vergleich war streng mit der Zeit korreliert, d.h. jedes mehrmals gespritzte Kollektiv wurde auch wieder nur mit einem neuen Kollektiv, das nur 1 Injektion erhalten hatte, zur gleichen Zeit verglichen. Injiziert wurden jeweils 5 g Äq Milzextrakt nach 2 x G - 10 (Einfacher ME); jedem Tier wurde nur einmal Blut abgenommen.

U 4.2.1

Verhalten der Leukozytenzahl (Abb. 21 und Tab. 13)

Die mehrmaligen ME-Injektionen senken die Gesamtleukozytenzahl signifikant stärker als eine einmalige Injektion. Nach 4 Injektionen, d.h. beim Abnahmezeitpunkt 72 h, sind die Leukozyten aber gegenüber den einmal behandelten Tieren signifikant erhöht (evtl. Belastung durch mehrmalige Injektionen, verstärkte Gegenregulation, Infektionsgefahr höher). 2 Injektionen senken die Leukozytenzahl gegenüber 1 Injektion um zusätzlich 20 %, 3 Injektionen auch nur um zusätzlich 20 %.

Std. n. Erstinj.	8	24	48	72
E / NaCl	ns	↓	↓	ns
E / Unbeh.	ns	↓	ns	ns
W / NaCl	-	↓	↓	ns
W / Unbeh.	-	↓	↓	ns
W / E	-	↓	↓	↑

Tab. 13: L e u k o z y t e n (Milz)

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach einmaliger (E) und wiederholter (W) Injektion von 5 g Äq Milz (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

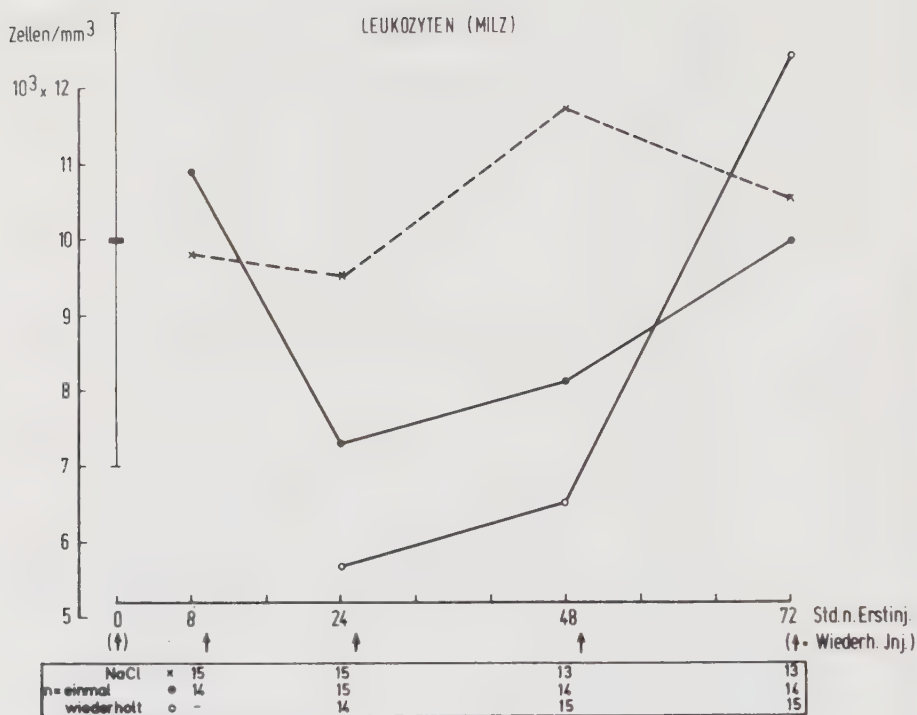


Abb. 21: Leukozyten nach NaCl (x---x) und einer einmaligen (●—●) bzw. mehrmaligen (○—○) Injektion von 5 g Äq Milzextrakt.

↑ = Injektionen der wiederholt behandelten Tiere

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs.

(Zum Zeitpunkt 0 wurden alle Kollektive gespritzt; bis zum Abnahmezeitpunkt 24 h haben die wiederholt behandelten Tiere 2, bis 48 h 3 und bis 72 h 4 Injektionen erhalten.)

3 4.2.2 Verhalten der Granulozytenzahl (Abb. 22 und Tab. 14)

Gegenüber einer einmaligen Injektion verändern die mehrmaligen Injektionen von ME die Zahl der Granulozyten nicht signifikant (alle Werte aber etwas niedriger). In der 24. und 48. Stunde liegen bei allen Kollektiven die Werte im Normalbereich. In der 72. Stunde steigt die Granulozytenzahl nach einmaliger Injektion etwas stärker als nach mehrmaliger Extraktgabe.

Std. n.Erstinj.	8	24	48	72
E / NaCl	↑	ns	ns	↑
E / Unbeh.	↑	ns	ns	↑
W / NaCl	-	ns	ns	ns
W / Unbeh.	-	ns	ns	ns
W / E	-	ns	ns	ns

Tab. 14: G r a n u l o z y t e n (Milz)

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach einmaliger (E) und wiederholter (W) Injektion von 5 g Äq Milz (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

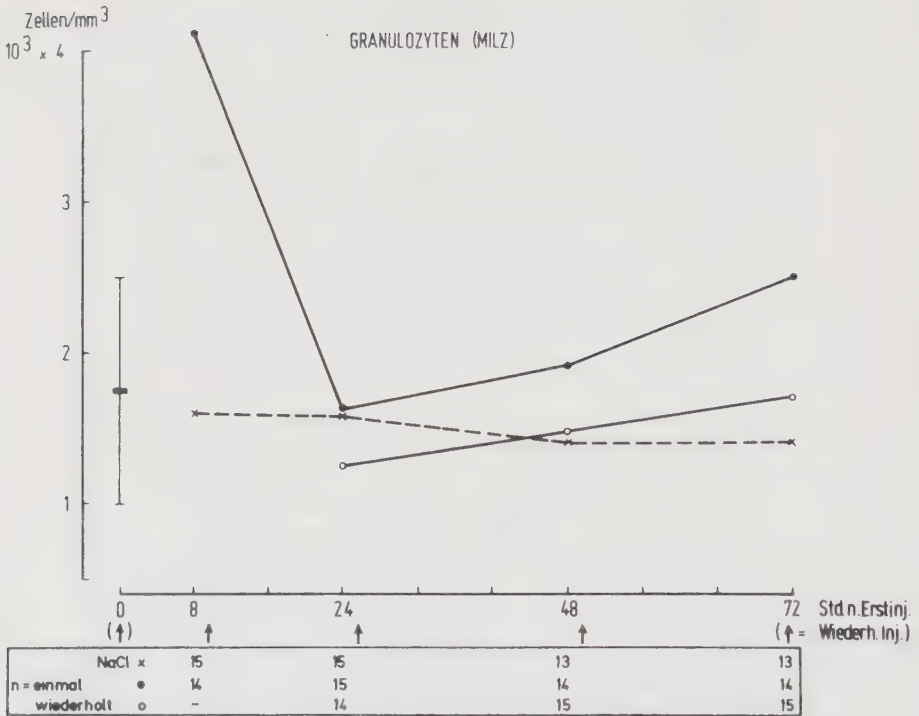


Abb. 22: Granulozyten nach NaCl (x---x) und einer einmaligen (●—●) bzw. mehrmaligen (○—○) Injektion von 5 g Äq Milzextrakt.

↑ = Injektionen der wiederholt behandelten Tiere

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs.

(Zum Zeitpunkt 0 wurden alle Kollektive gespritzt; bis zum Abnahmezeitpunkt 24 h haben die wiederholt behandelten Tiere 2, bis 48 h 3 und bis 72 h 4 Injektionen erhalten.)

3 4.2.3 Verhalten des Kernverschiebungsindex (Abb. 23 und Tab. 15)

Der Kernverschiebungsindex 24 Stunden nach der ersten Injektion ist bei der mehrmaligen Injektion signifikant gegenüber der einmaligen erhöht (nicht gegenüber 0,9% NaCl). Da zu diesem Zeitpunkt die Granulozyten bei der wiederholten Injektion niedriger als bei der einmaligen Injektion liegen (vgl. C 4.2.2), vermehrt die wiederholte Injektion einseitig die stabkernigen Granulozyten. Während der übrigen Zeiten entsprechen sich die Werte bei ein- und mehrmaliger Injektion ziemlich genau. Einmalige und mehrmalige Injektionen senken in der 48. Stunde (einmalige auch in der 24. Stunde) den KI gegenüber 0,9% NaCl signifikant - unter längerdauernder Extrakteinwirkung tritt also eine Verzögerung in der Granulozytenproliferation auf.

Std. n.Erstinj.	8	24	48	72
E / NaCl	ns	↓	↓	ns
E / Unbeh.	ns	↓	↓	ns
W / NaCl	-	ns	↓	ns
W / Unbeh.	-	↑	ns	ns
W / E	-	↑	ns	ns

Tab. 15: K e r n v e r s c h i e b u n g s -
i n d e x (Milz). ↑ = signifikante Erhöhung,
↓ = signifikante Senkung nach einmaliger (E)
und wiederholter (W) Injektion von 5 g Äq Milz
(zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns =
nicht signifikant)

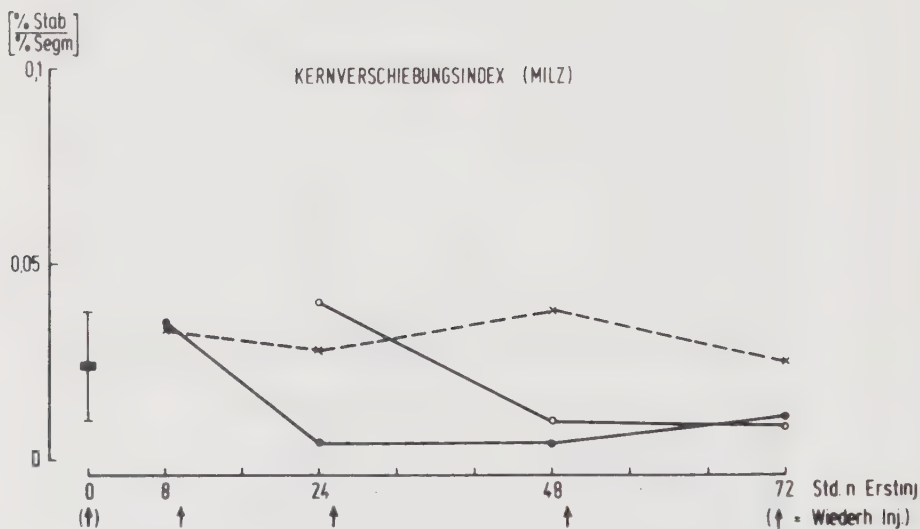


Abb. 28: Kernverschiebungsindex nach NaCl (x---x) und einer einmaligen (•—•) bzw. mehrmaligen (o—o) Injektion von 5 g Aq Milzextrakt.

↑ = Injektionen der wiederholt behandelten Tiere

(Zum Zeitpunkt 0 wurden alle Kollektive gespritzt; bis zum Abnahmezeitpunkt 24 h haben die wiederholt behandelten Tiere 2, bis 48 h 3 und bis 72 h 4 Injektionen erhalten.)

C 4.2.4 Verhalten der Lymphozytenzahl (Abb. 24 und Tab. 16)

Die Lymphopenie (schon unter C 2 festgestellt) fand sich auch hier. Sie war bei mehrmaliger Injektion von ME etwas stärker ausgeprägt als bei einmaliger Behandlung. Bei 72 Stunden übersteigt die Zunahme der Lymphozyten der mehrmals gespritzten Tiere die der einmal Behandelten. Beide Kollektive waren bis zur 48. Stunde gegenüber 0,9% NaCl signifikant erniedrigt.

Std. n.Erstinj.	8	24	48	72
E / NaCl	↓	↓	↓	ns
E / Unbeh.	↓	↓	ns	ns
W / NaCl	-	↓	↓	ns
W / Unbeh.	-	↓	↓	ns
W / E	-	ns	ns	↑

Tab. 16: L y m p h o z y t e n (Milz)

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach einmaliger (E) und wiederholter (W) Injektion von 5 g Äq Milz (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

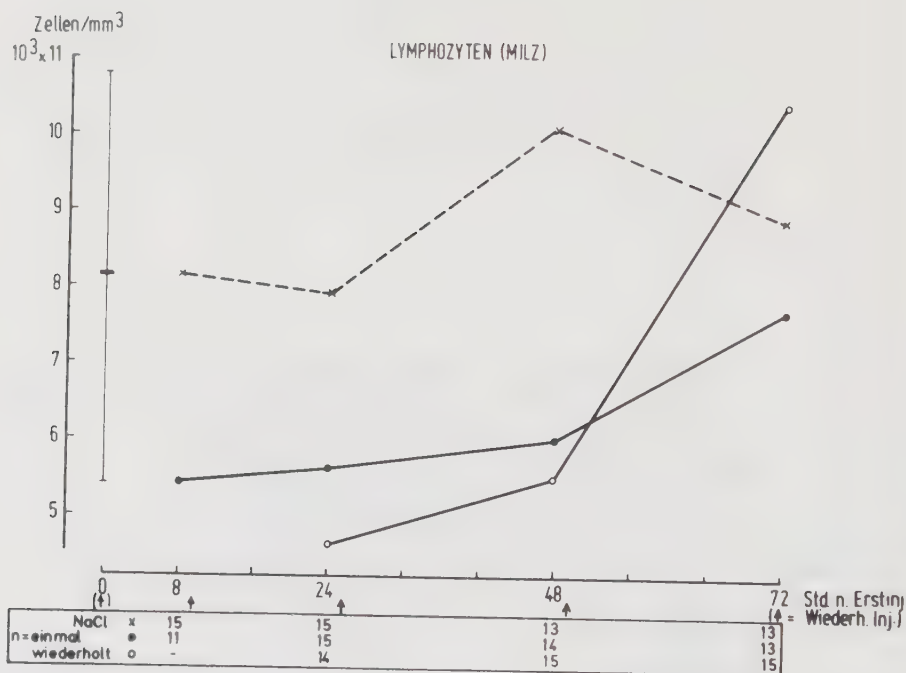


Abb. 29: L y m p h o z y t e n nach NaCl
(x---x) und einer einmaligen (●—●) bzw. mehr-
maligen (○—○) Injektion von 5 g Äq Milzextrakt.

↑ = Injektionen der wiederholt behandelten Tiere

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs.

(Zum Zeitpunkt 0 wurden alle Kollektive gespritzt;
bis zum Abnahmezeitpunkt 24 h haben die wiederholt
behandelten Tiere 2, bis 48 h 3 und bis 72 h
4 Injektionen erhalten.)

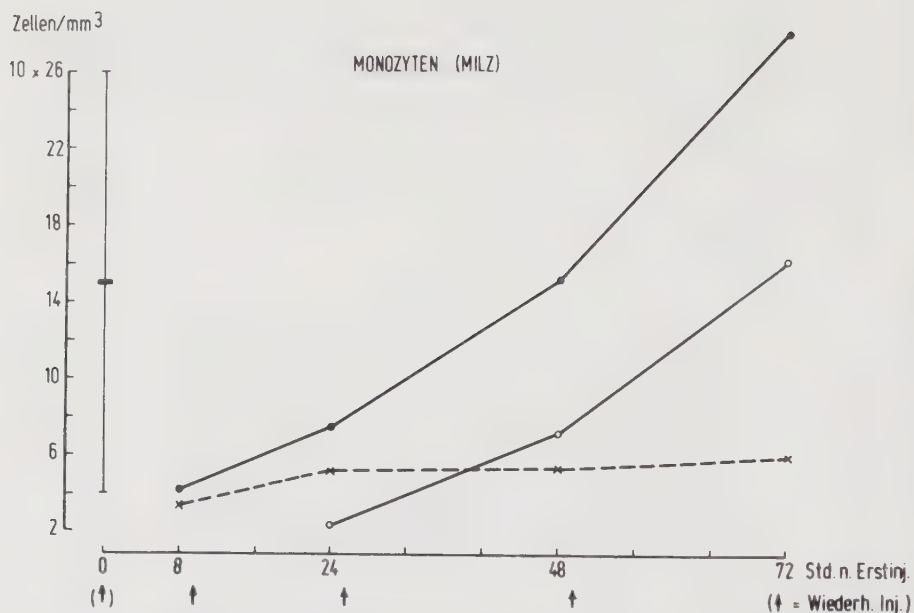
C 4.2.5 Verhalten der Monozytenzahl (Abb. 25 und Tab. 17)

Unter mehrmaligen Injektionen von ME stiegen die Monozyten zwar auch an (wie bei einmaliger Extraktgabe), sie blieben jedoch jeweils signifikant unter den Werten der einmal behandelten Vergleichsgruppen.

Std. n.Erstinj.	8	24	48	72
E / NaCl	ns	↑	↑	↑
E / Unbeh.	ns	ns	ns	↑
W / NaCl	-	↓	ns	↑
W / Unbeh.	-	↓	ns	ns
W / E	-	↓	↓	↓

Tab. 17: M o n o z y t e n (Milz)

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach einmaliger (E) und wiederholter (W) Injektion von 5 g Äq Milz (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)



NaCl	x	15	15	13	13
n = einmal	●	13	15	14	13
wiederholt	○	-	14	15	15

Abb. 30: Monocyten nach NaCl (x---x) und einer einmaligen (●—●) bzw. mehrmaligen (○—○) Injektion von 5 g Äq Milzextrakt.

↑ = Injektionen der wiederholt behandelten Tiere

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs.

(Zum Zeitpunkt 0 wurden alle Kollektive gespritzt; bis zum Abnahmezeitpunkt 24 h haben die wiederholt behandelten Tiere 2, bis 48 h 3 und bis 72 h 4 Injektionen erhalten.)

4.2.3 Vergleich der einmal mit den wiederholt behandel-
ten Tieren

Mehrmalige Injektionen von ME bringen gegenüber einer einmaligen Applikation eine Verstärkung der Milzextraktwirkung hinsichtlich der Leukopenie und Lymphopenie (jeweils in der 24. und 48. Stunde). Eine weitere Extraktgabe (Abnahme nach der 72. Stunde) bringt keine zusätzliche Wirkung, sondern verstärkt eher die Gegenregulation (mit Lympho- und Leukozytose). Die Verstärkung der Milzextraktwirkung durch eine 2. Injektion beträgt rund 20 %.

C 4.3 Blutbild nach einmaliger und wiederholter Injektion von Serumextrakt

Das gleiche Versuchsschema, das die Abhängigkeit der Milzextraktwirkung von mehrmaligen Injektionen aufzeigen sollte, wurde beim Serumextrakt angewandt. Gespritzt wurden jeweils 10 ml Äq Serum nach 2 x G - 10 (Einfacher Serumextrakt), jedem Tier wurde nur einmal Blut abgenommen.

C 4.3.1 Verhalten der Leukozytenzahl (Abb. 26 und Tab. 18)

Die Verschiebungen der Gesamtleukozytenzahl sind zwar bei beiden Applikationsformen (einmalige bzw. mehrmalige Injektion) bis zur 72. Stunde signifikant vom NaCl-Vergleichskollektiv verschieden, bewegen sich aber alle innerhalb des Streubereichs der unbehandelten Tiere. Die Abnahmen zur 48. und 72. Stunde zeigen, daß die wiederholten Injektionen die Leukozyten signifikant stärker senken ($\sim 25\%$) als eine einmalige Injektion.

Die 72. Stunde zeigt eine Tendenz zur Normalisierung der Zellenzahlen an.

Std. n.Erstinj.	8	24	48	72
E / NaCl	↓	↓	↓	ns
E / Unbeh.	ns	ns	ns	ns
W / NaCl	-	↓	↓	↓
W / Unbeh.	-	ns	ns	ns
W / E	-	ns	↓	↓

Tab. 18: L e u k o z y t e n (Serum)

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach einmaliger (E) und wiederholter (W) Injektion von 10 ml Äq Serum (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

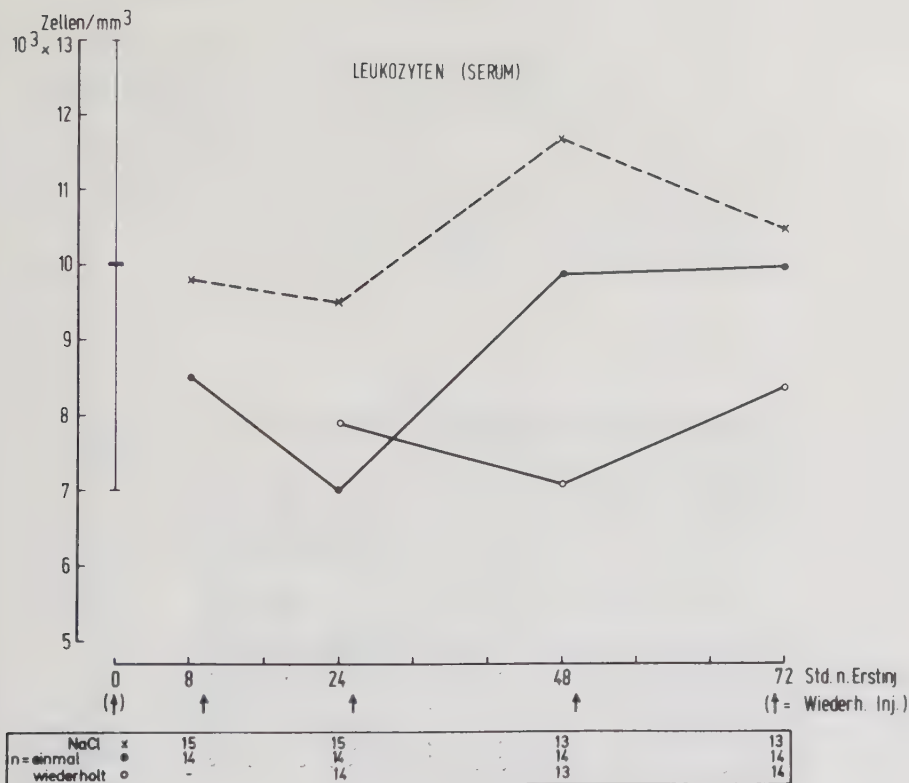


Abb. 26: Leukozyten nach NaCl (x---x) und einer einmaligen (•—•) bzw. mehrmaligen (o—o) Injektion von 10 ml Äq Serumextrakt.

↑ = Injektionen der wiederholt behandelten Tiere

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs.

(Zum Zeitpunkt 0 wurden alle Kollektive gespritzt; bis zum Abnahmezeitpunkt 24 h hatten die wiederholt behandelten Tiere 2, bis 48 h 3 und bis 72 h 4 Injektionen erhalten.)

C 4.3.2 Verhalten der Granulozytenzahl (Abb. 27 und Tab. 19)

Bei der 24 - Stunden - Abnahme liegen die Werte der einmaligen und wiederholten Injektion signifikant über der NaCl-Gruppe und über dem unbehandelten Kollektiv. Ab der 48. Stunde zeigt sich eine Nivellierung auf hochnormale Werte. Ein- bzw. mehrmalige Injektionen lassen sich zu keiner Zeit statistisch sicher voneinander trennen.

Std. n.Erstinj.	8	24	48	72
E / NaCl	↑	↑	↑	↑
E / Unbeh.	↑	↑	ns	ns
W / NaCl	-	↑	ns	ns
W / Unbeh.	-	↑	ns	ns
W / E	-	ns	ns	ns

Tab. 19: G r a n u l o z y t e n (Serum)

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach einmaliger (E) und wiederholter (W) Injektion von 10 ml Äq Serum (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

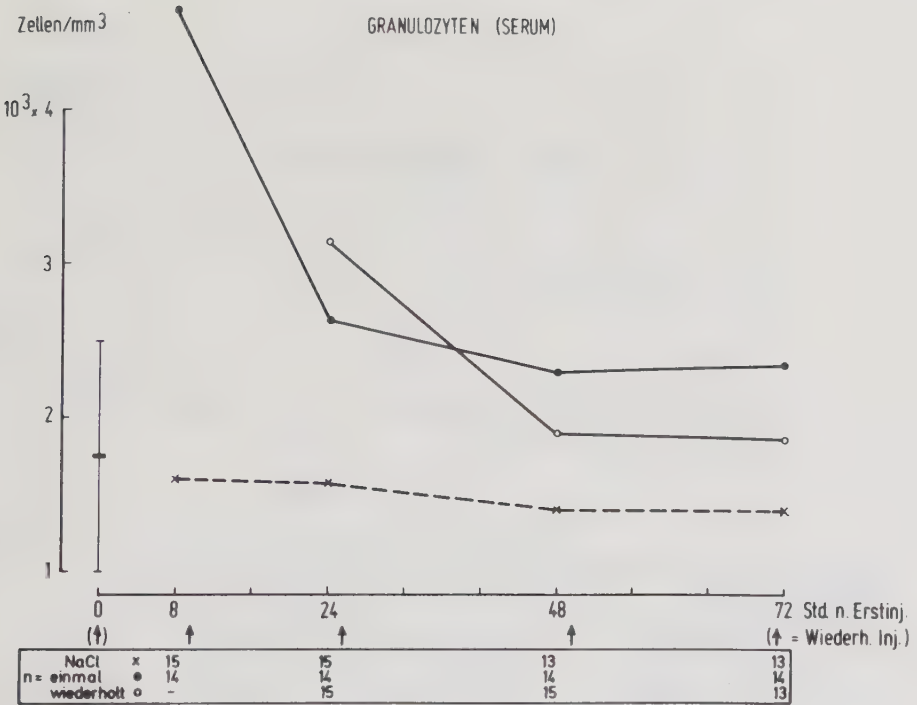


Abb. 27: Granulozyten nach NaCl (x---x) und einer einmaligen (•—•) bzw. mehrmaligen (o—o) Injektion von 10 ml Äq Serum-extrakt.

↑ = Injektionen der wiederholt behandelten Tiere

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs.

(Zum Zeitpunkt 0 wurden alle Kollektive gespritzt; bis zum Abnahmezeitpunkt 24 h haben die wiederholt behandelten Tiere 2, bis 48 h 3 und bis 72 h 4 Injektionen erhalten.)

3 4.3.3. Verhalten des Kernverschiebungsindex
(Abb. 28 und Tab. 20)

Einmalige und wiederholte Injektionen zeigen in der 48. Stunde einen statistisch zu sichernden Unterschied (W signifikant unter E). Die Granulozytose in der 24. Stunde ist nicht von einer Vermehrung vorwiegend jugendlicher Zellen begleitet. In der 72. Stunde ist bei einmal und wiederholt gespritzten Tieren ein starker Anstieg der Stabkernigen (bei gleichbleibender Granulozytenzahl) feststellbar. In der 8. Stunde bei den einmal Behandelten und in der 24. sowie 48. Stunde bei den mehrmals Behandelten wird der KI unter Serumextraktgabe gegenüber 0,9% NaCl signifikant gesenkt (relativ verlangsamte Produktion von stabkernigen Granulozyten).

Std. n.Erstinj.	8	24	48	72
E / NaCl	↓	ns	ns	ns
E / Unbeh.	↓	ns	ns	ns
W / NaCl	-	↓	↓	ns
W / Unbeh.	-	↓	↓	ns
W / E	-	ns	↓	ns

Tab. 20: K e r n v e r s c h i e b u n g s -
i n d e x (Serum)

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante
Senkung nach einmaliger (E) und wiederholter (W)
Injektion von 10 ml Äq Serum (zweiseitige Frage-
stellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

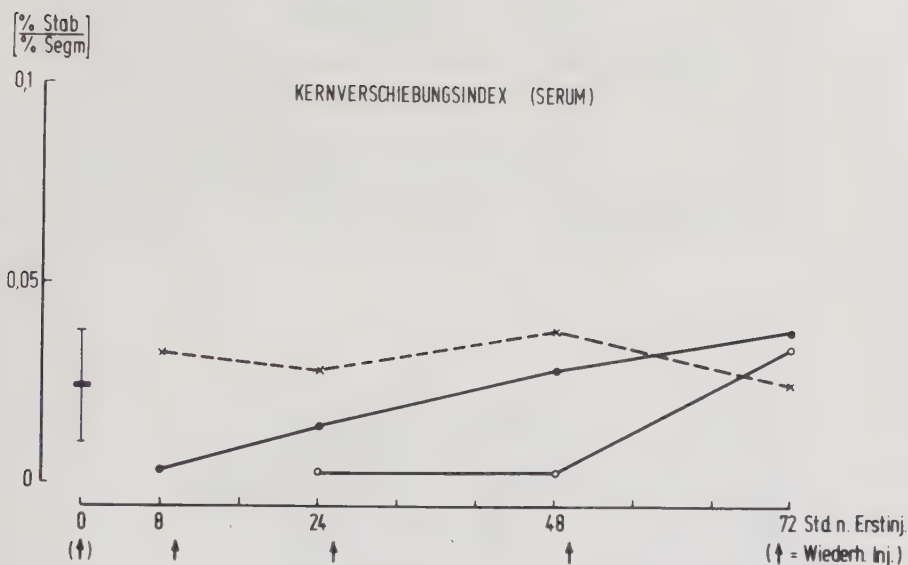


Abb. 23: Kernverschiebungsindex nach NaCl (x--x) und einer einmaligen (•—•) bzw. mehrmaligen (○—○) Injektion von 10 ml Äq Serumextrakt.

↑ = Injektionen der wiederholt behandelten Tiere

(Zum Zeitpunkt 0 wurden alle Kollektive gespritzt; bis zum Abnahmezeitpunkt 24 h haben die wiederholt behandelten Tiere 2, bis 48 h 3 und bis 72 h 4 Injektionen erhalten.)

C 4.3.4 Verhalten der Lymphozytenzahl (Abb. 29 und Tab. 21)

Die Lymphopenie nach einmaliger Injektion, in der 8. Stunde besonders stark ausgeprägt, hielt sich bis zur 48. Stunde signifikant unter 0,9% NaCl (bis zur 24. Stunde auch signifikant gegen die unbehandelten Tiere), in der 72. Stunde war sie nicht mehr nachzuweisen. Die mehrmaligen Injektionen verlängerten die Lymphopenie (sie war hier auch in der 72. Stunde noch signifikant gegenüber 0,9% NaCl) und verstärkten sie (in der 48. und 72. Stunde signifikant gegenüber den einmal behandelten Tieren).

Std. n.Erstinj.	8	24	48	72
E / NaCl	↓	↓	↓	ns
E / Unbeh.	↓	↓	ns	ns
W / NaCl	-	↓	↓	↓
W / Unbeh.	-	↓	↓	ns
W / E	-	ns	↓	↓

Tab. 21: L y m p h o z y t e n (Serum)

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante

Senkung nach einmaliger (E) und wiederholter (W)

Injektion von 10 ml Äq Serum (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

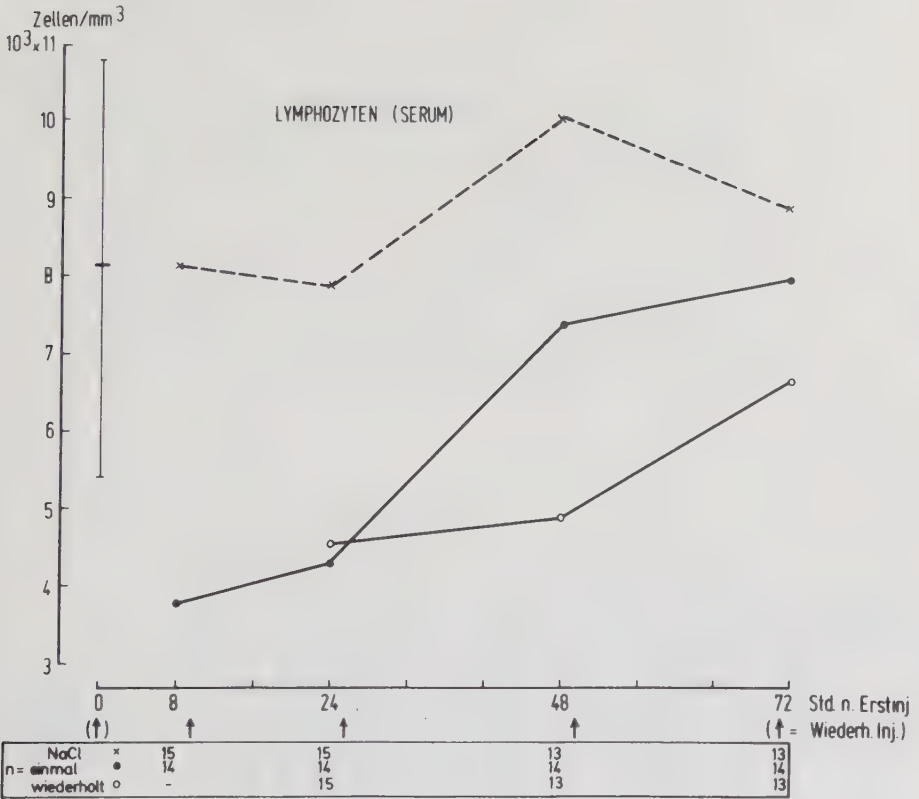


Abb. 24: L y m p h o z y t e n nach NaCl
(x---x) und einer einmaligen (•—•) bzw. mehr-
maligen (o—o) Injektion von 10 ml Äq Serum-
extrakt.

↑ = Injektionen der wiederholt behandelten Tiere

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs.

(Zum Zeitpunkt 0 wurden alle Kollektive gespritzt;
bis zum Abnahmezeitpunkt 24 h haben die wiederholt
behandelten Tiere 2, bis 48 h 3 und bis 72 h
4 Injektionen erhalten.)

C 4.3.5 Verhalten der Monozytenzahl (Abb. 30 und Tab. 22)

Unter den wiederholten Injektionen stieg die Monozytenzahl gegenüber der nach einmaliger Injektion signifikant an. Die einmalige Injektion bringt nur einen langsamen, erst in der 72. Stunde gegen 0,9% NaCl signifikant erhöhten Anstieg der Monozyten.

Bei der großen Streubreite des Normalkollektivs kann weder bei den einmal noch bei den mehrmals injizierten Tieren von einer eigentlichen Monozytose gesprochen werden.

Std. n.Erstinj.	8	24	48	72
E / NaCl	ns	ns	ns	↑
E / Unbeh.	ns	ns	ns	ns
W / NaCl	-	↑	↑	↑
W / Unbeh.	-	ns	ns	ns
W / E	-	↑	↑	↑

Tab. 22: M o n o z y t e n (Serum)

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante

Senkung nach einmaliger (E) und wiederholter (W)

Injektion von 10 ml Äq Serum (zweiseitige Fragestellung, 5 %-Niveau, ns = nicht signifikant)

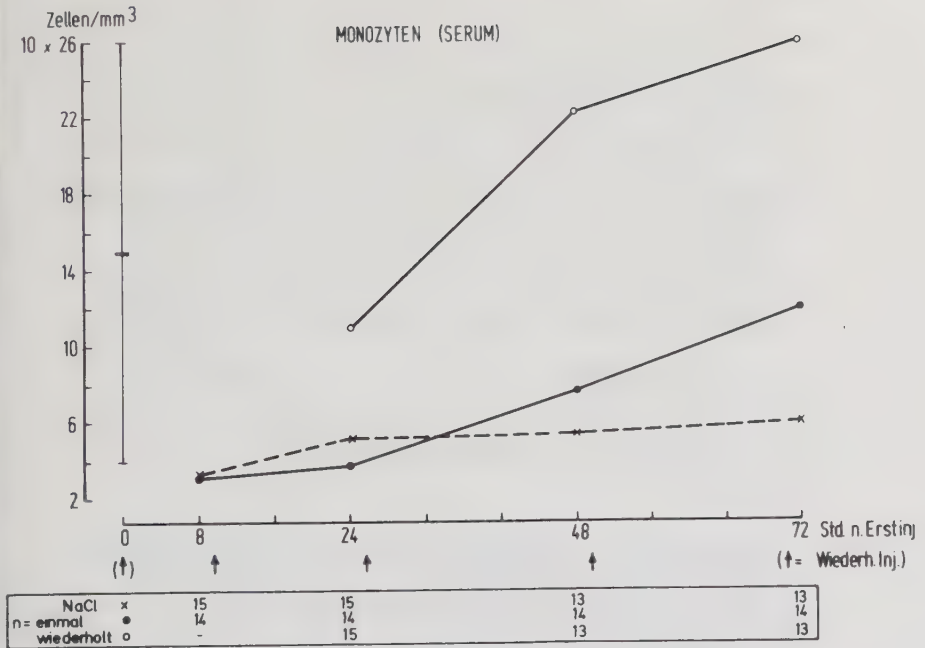


Abb. 25: Monozyten nach NaCl (x---x) und einer einmaligen (•—•) bzw. mehrmaligen (o—o) Injektion von 10 ml Äq Serumextrakt.

↑ = Injektionen der wiederholt behandelten Tiere

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs.

(Zum Zeitpunkt C wurden alle Kollektive gespritzt; bis zum Abnahmezeitpunkt 24 h haben die wiederholt behandelten Tiere 2, bis 48 h 3 und bis 72 h 4 Injektionen erhalten.)

C 4.3.c Vergleich der einmal mit den wiederholt behandelten Tieren

Mehrmalige Serumextrakt-Injektionen zeigen gegenüber einer einmaligen Injektion eine stärkere und länger andauernde Leukopenie und Lymphopenie ($\sim 25 \%$). Die Abnahme zur 72. Stunde zeigt aber auch die beginnende Gegenregulation mit Tendenz zur Normalisierung (bei beiden Applikationsformen). Unter der mehrmaligen Behandlung wird die Zahl der stabkernigen Granulozyten stärker gesenkt als nach einer einmaligen Injektion. Die Zunahme der Monozytenzahl war nach mehrmaliger Extraktgabe wesentlich stärker ausgeprägt als bei einmaliger Injektion.

C 4.4 Vergleich der Milzextrakt- und Serumextraktwirkung bei einmaliger und wiederholter Injektion

Eine annähernde Entsprechung der Milzextrakt- und Serumextraktwirkung ergab sich bei Kontrolle der

- Leukozytenzahl
- Granulozytenzahl
- Lymphozytenzahl

Die Depression der Zahl der L e u k o z y t e n hielt sich bei mehrmaligen ME-Injektionen nur bis zur 48. Stunde, bei mehrmaligen SE-Injektionen länger. Der Milzextrakt scheint bei wiederholter Anwendung eine stärkere Gegenregulation als der Serumextrakt hervorzurufen. Das Verhältnis von einmaliger zu mehrmaliger Injektion ist nach ME und SE ungefähr gleich in der 48. Stunde.

Die Zahl der Granulozyten ergab nach ME und SE ein fast identisches Bild (mit Ausnahme der 24. Stunde). Beiden Extrakten ist die Nivellierungstendenz ab der 24. Stunde gemeinsam, bei beiden Extrakten rufen ein- und mehrmalige Injektionen ein ähnliches Bild hervor: Kurzzeitig Granulozytose mit leichter Linksverschiebung, im weiteren Verlauf Absinken der Zahl der stabkernigen Granulozyten, wobei mehrmalige Injektionen die Zahl der Stabkernigen stärker senken als eine einmalige Injektion.

Die Lymphopenie nach ME entspricht bis zur 72. Stunde weitgehend der nach SE (beim SE noch stärker ausgeprägt): wiederholte Injektionen senken die Zahl der Lymphozyten stärker als eine einmalige Injektion. Die wiederholten ME-Injektionen haben in der 72. Stunde eine stärkere Gegenregulation als beim Serumextrakt zur Folge.

Der Anstieg der Zahl der Monozyten tritt nach beiden Extrakten auf; ein Unterschied besteht darin, daß die wiederholten Injektionen mit Milzextrakt einen geringeren Anstieg, die wiederholten Serumextrakt-Injektionen einen stärkeren Anstieg hervorrufen als die jeweiligen einmaligen Injektionen.

D E R G E B N I S S E M I T L Y M P H A D E -
 N O T I S C H E N M Ä U S E N (L E U K Ä M I E V E R S U C H E)

Die Prüfung der Milz- und Serumextrakte an den gesunden NMRI - Mäusen hatte die leuko- und lympho-depressiven Wirkungen der Extrakte deutlich gemacht. Deshalb sollte nun in den folgenden Versuchen die Frage geklärt werden, inwieweit sich das weiße Blutbild lymphadenotischer C 57 BL 6/J - Mäuse (abgekürzt CBL-Mäuse) in verschiedenen Krankheitsstadien beeinflussen läßt und ob mit den Extrakten eine Verlängerung der Überlebenszeit dieser Tiere möglich ist.

D 1 W e i ß e s B l u t b i l d u n d Ü b e r -
 l e b e n s r a t e n a c h e i n m a l i g e r u n d w i e d e r -
 h o l t e r M i l z e x t r a k t - I n j e k t i o n (v g l . S . 1 6 8 - 1 7 2)

D 1.1 Versuchsaufbau und zeitlicher Verlauf der Leukämie

Blutbildkontrollen zu verschiedenen Stadien des Krankheitsverlaufes sollten das Fortschreiten der Leukose (Kontrolltiere) und die evtl. Beeinflußbarkeit durch Milzextrakt aufzeigen. Dabei wurden 93 Stunden nach Tumortransplantation (s. B 4.1.2) allen Tieren 0,1 ml 0,9 % NaCl bzw. 5 g Äq Milzextrakt/Tier (2 x G - 10, 2 Dialysen) injiziert. Dann wurden die Tiere in drei NaCl- und drei ME-Kollektive eingeteilt und wie aus Abb. 31 ersichtlich weiterbehandelt. Hierbei wurde der Zeitabstand zwischen Injektion und Abnahme immer erweitert (4, 22, 42 Stunden), was die Zeitabstände 4, 28 und 72 Stunden nach

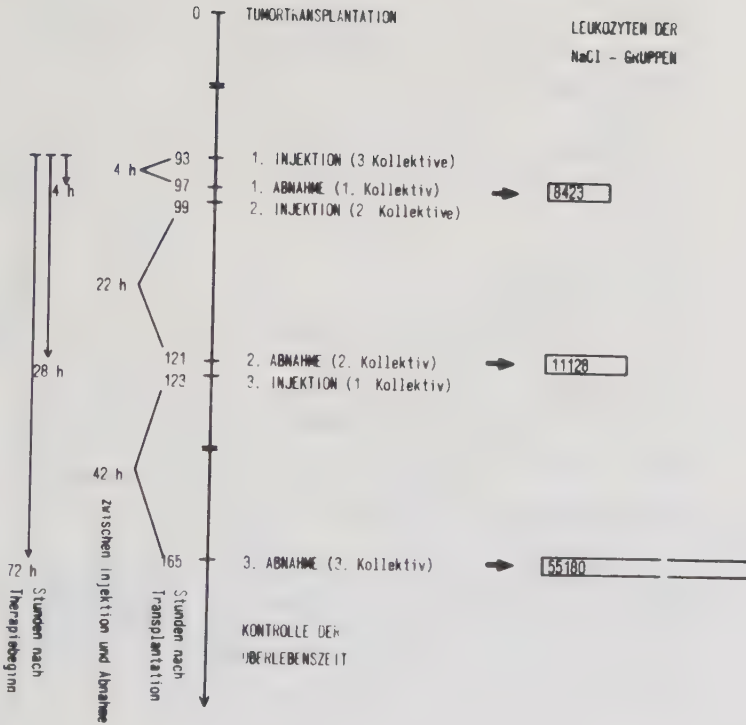


Abb. 51: Versuchsaufbau bei ein- und mehrmaliger Milzextrakt-Injektion.

Zeitlicher Verlauf der Leukämie (Leukozytenzahlen der NaCl-Kollektive)

Erstinjektion ergab. Die dabei ermittelten Leukozytenwerte nach Injektion von physiol. NaCl-Lösung zeigen (vgl. Abb. 31), daß sich die Leukozytenzahlen bis zur 121. Stunde (bezogen auf Tumortransplantation = Zeitpunkt 0) im Normalbereich halten, erst bis zur 165. Stunde sind sie dann auf stark erhöhte Werte um $55000/\text{mm}^3$ angestiegen. Bei dieser Abnahme nach 165 Stunden waren die Tiere schon in einem sehr schlechten Allgemeinzustand (Bewegungsarmut, Kauerstellung, rauhes Fell, ataktische Bewegungen und Zittern).

D 1.2 Weißes Blutbild

Mit dem Fortschreiten der Krankheit, d.h. vor allem am Abnahmezeitpunkt 165 Stunden, fanden sich in den Ausstrichen verschiedentlich auch Zelltrümmer sowie deformierte Zellen, deren exakte Zuordnung Schwierigkeiten bereitete.

Ausgezählt wurden jeweils wieder 200 Zellen; zur besseren Übersicht sind die absoluten Zahlen der bei den jeweiligen Abnahmezeitpunkten erhobenen Befunde in den Tabellen 28 - 30 angegeben.

D 1.2.1. Leukozytenzahlen (Abb. 32 und Tab. 23)

Bis zur 121. Stunde, (d.h. über 5 Tage nach Tumortransplantation) bewegten sich die Leukozytenzahlen sowohl nach 0,9% NaCl als auch nach ME (ME jeweils unter 0,9% NaCl) im Normbereich des unbehandelten Vergleichskollektivs, in der 165. Stunde waren sie nach 0,9% NaCl um das 5fache und nach ME um das 3fache über der Norm. Nur zwei Tiere mit ME - Behandlung hatten zu diesem Zeitpunkt noch

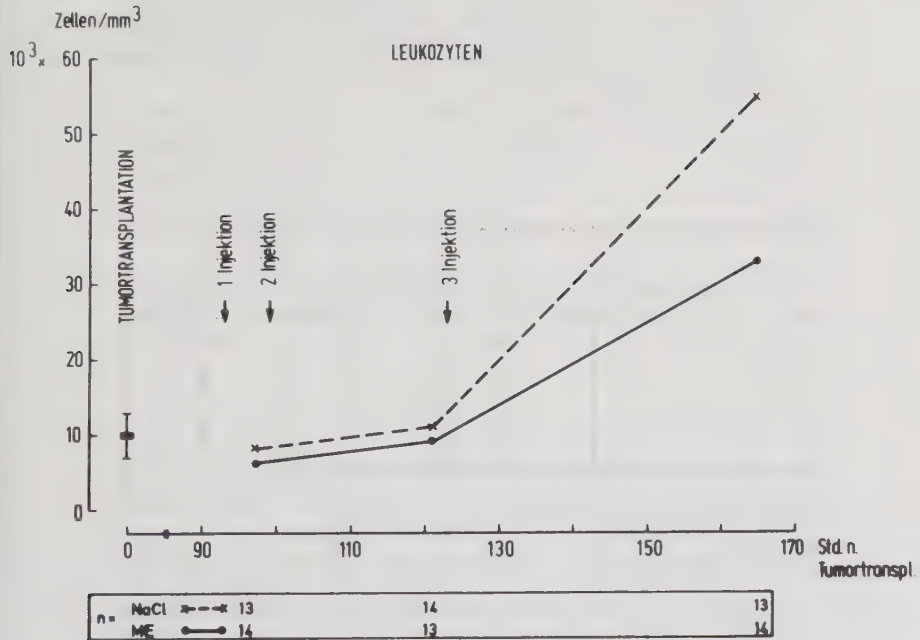


Abb. 32: Verhalten der Leukozyten von lymphadenotischen Mäusen nach einmaliger und wiederholter Injektion von 0,9 %iger Kochsalzlösung (x---x) bzw. 5 g Äq Milzextrakt/Tier (●—●). Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kollektivs (n = 30) eingezeichnet.

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs

keine pathologischen Leukozytenzahlen.

Bei der 1. Abnahme nach 97 Stunden und der 3. Abnahme nach 165 Stunden war die Leukozytenzahl nach Milzextrakt signifikant unter der nach 0,9% NaCl-Lösung - d.h. die als erste Wirkungskomponente des Milzextrakts bei den NMRI - Tieren gefundene Leukozytendepression fand sich auch bei den lymphadenotischen Mäusen.

Stunden nach Tumortranspl.	37	121	165
	1 Injekt.	2 Injekt.	3 Injekt.
ME / NaCl	↓	ns	↓
ME / Unbeh.	↓	ns	↑
NaCl / Unbeh.	ns	ns	↑

Tab. 23: Leukozyten

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach Milzextrakt gegenüber NaCl und Unbehandelte (zweiseitige Fragestellung, 5 % Niveau, ns = nicht signifikant)

(Milzextrakt nach 2 x G - 10, 2 Dialysen; 5 g Äq/Tier)

D 1.2.2 Zahl der stabkernigen Granulozyten

(Abb. 33 und Tab. 24)

In der 97. Stunde finden sich unter Milzextrakt gegenüber 0,9% NaCl und Unbehandelten signifikant vermehrt stabkernige Granulozyten, während sich der Wert nach 0,9% NaCl im Normbereich befindet. Die 121. Stunde bringt eine Normalisierung bei beiden Injektionen, in der 165. Stunde steigen die Stabkernigen mit der Leukozytose an - nach 0,9% NaCl höher (aber wegen der großen Streuung nicht signifikant) als nach ME.

Stunden nach Tumortranspl.	97	121	165
	1 Injekt.	2 Injekt.	3 Injekt.
ME / NaCl	↑	ns	ns
ME / Unbeh.	↑	ns	↑
NaCl / Unbeh.	ns	ns	↑

Tab. 24: S t a b k e r n i g e Granulozyten

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach Milzextrakt gegenüber NaCl und Unbehandelte (zweiseitige Fragestellung, 5 % Niveau, ns = nicht signifikant)

(Milzextrakt nach 2 x G - 10, 2 Dialysen ; 5 g Äq/Tier)

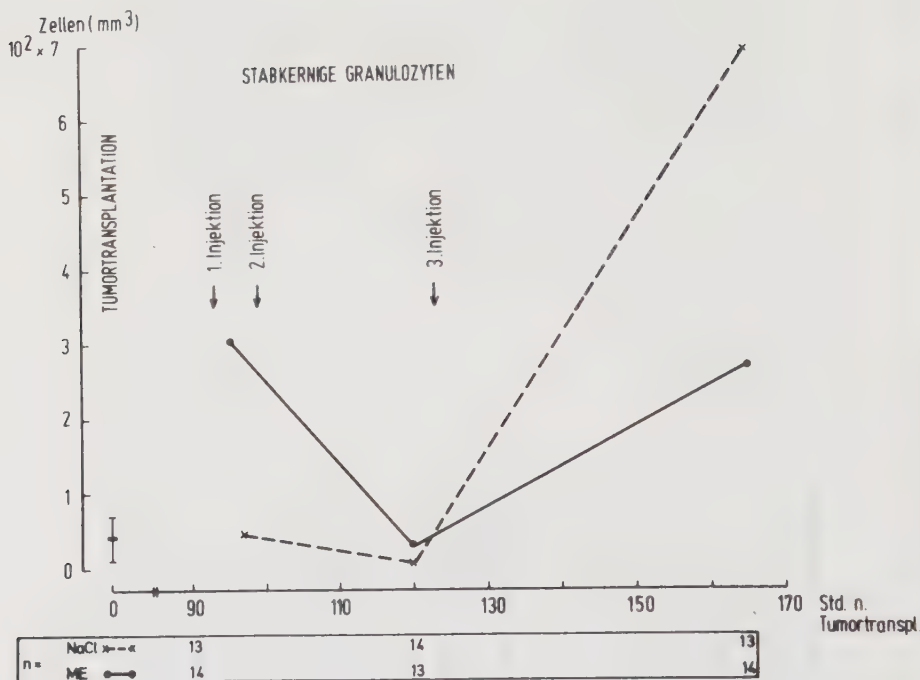


Abb. 33: Verhalten der stabkernigen Granulozyten von lymphadenotischen Mäusen nach einmaliger und wiederholter Injektion von 0,9 %iger Kochsalzlösung (x---x) bzw. 5 g Äq Milzextrakt/Tier (●—●). Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kollektivs (n = 30) eingezeichnet.
n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs

D 1.2.3 Zahl der segmentkernigen Granulozyten

(Abb. 34 und Tab. 25)

In der 97. und 121. Stunde liegen die segmentkernigen Granulozyten nach ME gegen 0,9% NaCl und unbehandelte Tiere signifikant höher - bis auf die 165. Stunde, wo der Wert nach Milzextrakt signifikant unter dem nach 0,9% NaCl liegt.

Der Kernverschiebungsindex (in Abb. 34 eingezeichnet) zeigt, daß die 97. Stunde eine deutlich vermehrte Produktion jugendlicher Granulozyten unter Milzextrakt bringt (entsprechend der Granulozytose mit Linksverschiebung in der 8. Stunde bei den NMRI - Tieren); zu den übrigen Zeiten ist der Kernverschiebungsindex bei den ME - Kollektiven erniedrigt (in der 165. Stunde gegenüber 0,9% NaCl signifikant).

Insgesamt scheint der Milzextrakt das Verhalten der Granulozyten und das Verhältnis von jugendlichen zu reifen Zellen ähnlich zu beeinflussen wie bei den NMRI - Tieren: kurzzeitig Granulozytose mit Linksverschiebung, dann relativ verlangsamte Produktion der stabkernigen Granulozyten.

Stunden nach Tumortranspl.	97	121	165
	1 Injekt.	2 Injekt.	3 Injekt.
ME / NaCl	↑	↑	↓
ME / Unbeh.	↑	↑	↑
NaCl / Unbeh.	ns	ns	↑

Tab. 25: Segmentkernige Granulozyten

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung

nach Milzextrakt gegenüber NaCl und Unbehandelte
(zweiseitige Fragestellung, 5 % Niveau, ns = nicht signifikant)

(Milzextrakt nach 2 x G - 10, 2 Sialysen; 5 g Ig/Tier)

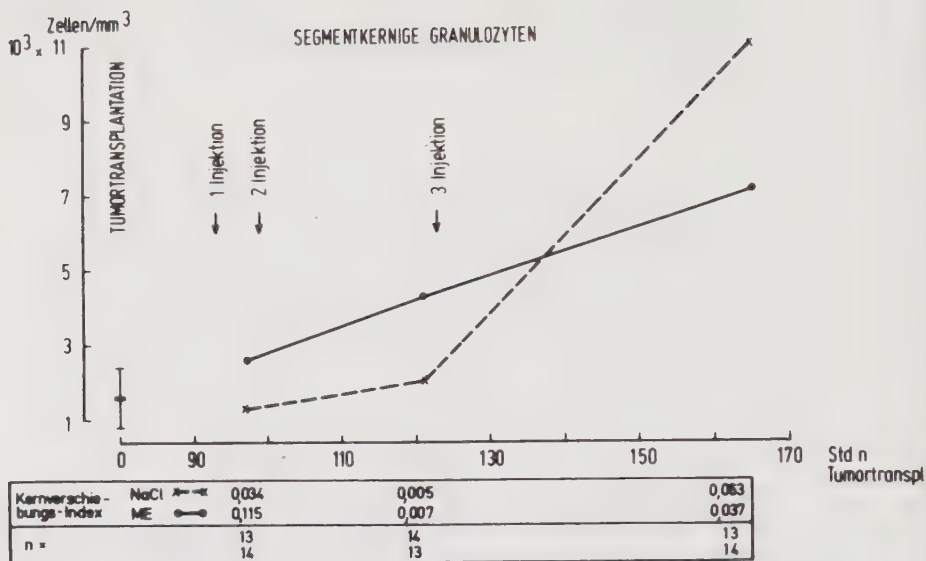


Abb. 34: Verhalten der segmentkernigen Granulozyten von lymphadenotomischen Mäusen nach einmaliger und wiederholter Injektion von 0,9 %iger Kochsalzlösung (x---x) bzw. 5 g Äq Milzextrakt/Tier (●—●). Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kollektivs (n = 30) eingezeichnet.

Unter den einzelnen Abnahmezeiten Angabe des Kernverschiebungsindex.

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs

D 1.2.4 Lymphozytenzahl (Abb. 35 und Tab. 26)

Die bei den NMRI-Mäusen unter Milzextrakt aufgetretene Lymphopenie fand sich auch bei den lymphadenotischen Mäusen voll ausgeprägt: Zu allen drei Abnahmezeiten bewegten sich die Lymphozytenzahlen nach ME signifikant unter denen nach 0,9% NaCl (bei logarithmischer Auftragung angenähert linearer Verlauf), in der 97. und 121. Stunde auch noch signifikant unter denen des Normalkollektivs.

Stunden nach Tumortranspl.	97	121	165
	1 Injekt.	2 Injekt.	3 Injekt.
ME / NaCl	↓	↓	↓
ME / Unbeh.	↓	↓	↑
NaCl / Unbeh.	ns	ns	↑

Tab. 26: L y m p h o z y t e n

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach Milzextrakt gegenüber NaCl und Unbehandelte (zweiseitige Fragestellung, 5 % Niveau, ns = nicht signifikant)

(Milzextrakt nach 2 x G - 10, 2 Dialysen; 5 g Äq/Tier)

Mit fortschreitender Krankheit (bei der 97-Stunden-Abnahme noch nicht) traten in verstärktem Maße zwei verschiedene Gruppen von Lymphozyten auf:

- die auch bei gesunden Tieren normalerweise vorhandenen kleinen Lymphozyten mit annähernd rundem Kern, schmalem blauem Cytoplasmasaum und vereinzelt roten Azurgranula
- Lymphoblasten mit großem meist rundem Kern und einem stark basophilen Cytoplasma (z.T. Vakuolen)

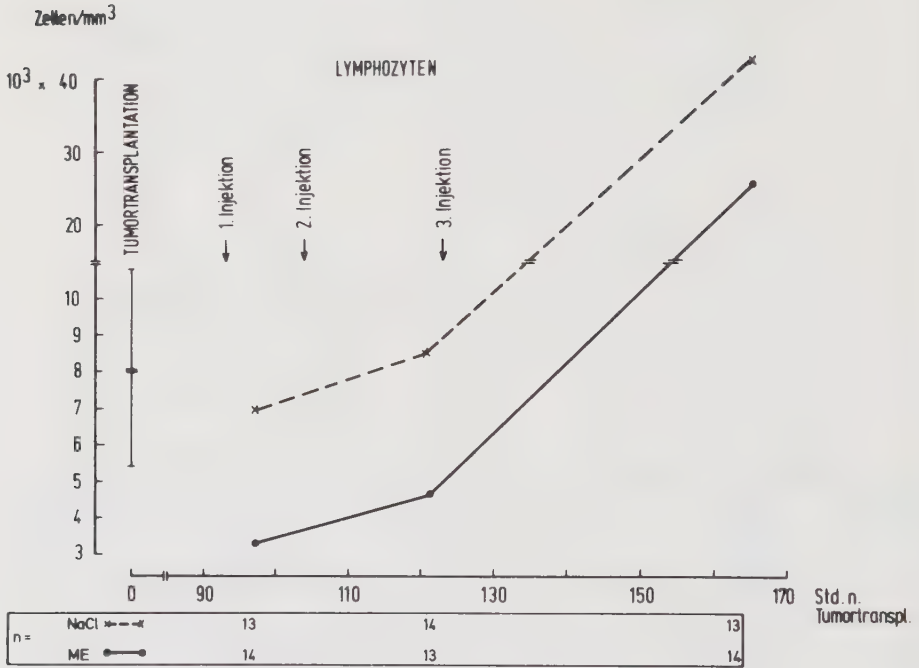


Abb. 35: Verhalten der L y m p h o z y t e n von lymphadenotischen Mäusen nach einmaliger und wiederholter Injektion von 0,9 %iger Kochsalzlösung (x---x) bzw. 5 g Äq Milzextrakt/Tier (●—●). Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kollektivs (n = 30) eingezeichnet.
n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs

Wie aus Abb. 36 hervorgeht, nehmen unter der Wirkung von Milzextrakt die Lymphoblasten im Verhältnis etwas langsamer zu als nach 0,9% NaCl - ein Hinweis darauf, daß unter Milzextrakt die Neuproduktion der Lymphozyten verlangsamt wird.

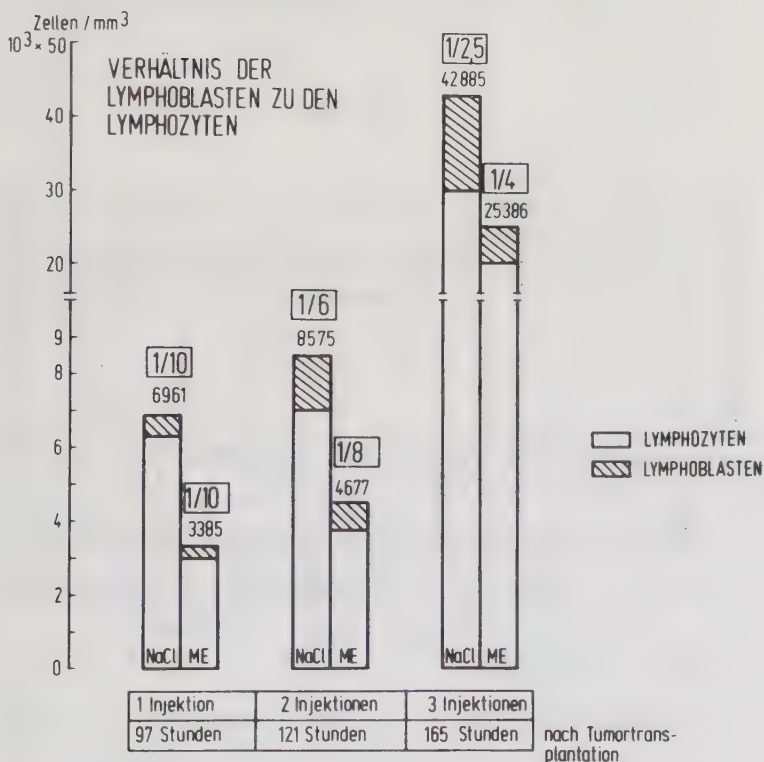


Abb. 36: Angenäherte Verhältnisse der Lymphoblasten zu den Lymphozyten bei den drei Abnahmezeitpunkten.

D 1.2.5 Monozytenzahl (Abb. 37 und Tab. 27)

Das Verhalten der Monozyten läßt keine eindeutige Beeinflussung durch den Milzextrakt erkennen. Gegenüber 0,9% NaCl einzig signifikant verändert ist die Erhöhung der Monozyten nach Milzextrakt in der 121. Stunde, während die 165. Stunde ein umgekehrtes Verhältnis zeigt. Der deutliche Monozyten-Anstieg bei den NMRI - Tieren unter ME blieb bei den CBL-Tieren aus.

Stunden nach Tumortranspl.	97	121	165
	1 Injekt.	2 Injekt.	3 Injekt.
ME / NaCl	ns	↑	ns
ME / Unbeh.	↓	↑	↑
NaCl / Unbeh.	ns	ns	↑

Tab. 27: M o n o z y t e n

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach Milzextrakt gegenüber NaCl und Unbehandelte (zweiseitige Fragestellung, 5 % Niveau, ns = nicht signifikant)

(Milzextrakt nach 2 x G - 10, 2 Dialysen; 5 g Äq/Tier)

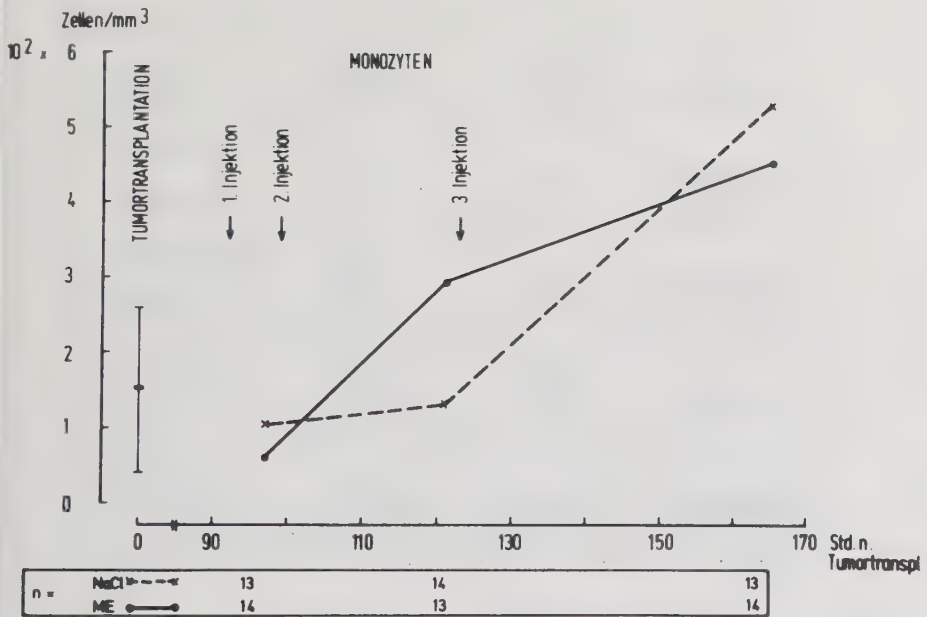


Abb. 37: Verhalten der Monozyten von lymphadenotomierten Mäusen nach einmaliger und wiederholter Injektion von 0,9 %iger Kochsalzlösung (x---x) bzw. 5 g Aq Milzextrakt/Tier (●—●). Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kollektivs ($n = 30$) eingezeichnet.

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs

	MILZ- EXTRAKT	0,9 % NaCl	p
LEUKOZYTEN	6328 ± 2128 (2 σ)	8423 ± 1520 (2 σ)	< 0,0001
STABKERNIGE GRANULOZYTEN	301 ± 442 (2 σ)	45 ± 136 (2 σ)	< 0,001
SEGMENTKERNIGE GRANULOZYTEN	2607 ± 2030 (2 σ)	1323 ± 1092 (2 σ)	< 0,001
LYMPHOZYTEN	3385 ± 2574 (2 σ)	6961 ± 1860 (2 σ)	< 0,0001
MONOZYTEN	61 ± 115 (2 σ)	106 ± 246 (2 σ)	< 0,5

(einmalige Injektion)

Tab. 28: Weißes Blutbild von lymphadenotischen CBL-Mäusen 4 Stunden nach einmaliger Injektion von 5 g Äq ME/Tier bzw. 0,9 % NaCl (= 97 Stunden nach Tumortransplantation)

(Zweiseitige Fragestellung, $p < 0,05$ = signifikanter Unterschied der absoluten Zellzahlen)

	MILZ- EXTRAKT	0,9 % NaCl	p
LEUKOZYTEN	9361 ± 2394 (2 σ)	11129 ± 6150 (2 σ)	< 0,2
STABKERNIGE GRANULOZYTEN	31 ± 25 (2 σ)	10 ± 9 (2 σ)	> 0,5
SEGMENTKERNIGE GRANULOZYTEN	4338 ± 2202 (2 σ)	2171 ± 1886 (2 σ)	< 0,0001
LYMPHOZYTEN	4677 ± 2776 (2 σ)	8575 ± 5128 (2 σ)	< 0,0001
MONOZYTEN	295 ± 218 (2 σ)	130 ± 250 (2 σ)	< 0,01

(zweimalige Injektion)

Tab. 29: Weißes Blutbild von lymphadenotischen CEL-Mäusen 22 Stunden nach zweimaliger Injektion von 5 g Äq ME/Tier bzw. 0,9 % NaCl (= 121 Stunden nach Tumor-transplantation)

(Zweiseitige Fragestellung, $p < 0,05$ = signifikanter Unterschied der absoluten Zellzahlen)

	MILZ- EXTRAKT	0,9 % NaCl	p
LEUKOZYTEN	33329 ±33250 (2σ)	55176 ±27092 (2σ)	< 0,001
STABKERNIGE GRANULOZYTEN	267 ±576 (2σ)	692 ±854 (2σ)	< 0,1
SEGMENTKERNIGE GRANULOZYTEN	7114 ±8510 (2σ)	11038 ±10804 (2σ)	< 0,05
LYMPHOZYTEN	25386 ±29534 (2σ)	42885 ±22658 (2σ)	< 0,01
MONOZYTEN	455 ±832 (2σ)	535 ±976 (2σ)	> 0,5

(dreimalige Injektion)

Tab. 30: Weißes Blutbild von lymphadenotischen CBL-Mäusen 42 Stunden nach dreimaliger Injektion von 5 g Äq ME/Tier bzw. 0,9 % NaCl (= 165 Stunden nach Tumortransplantation)

(Zweiseitige Fragestellung, $p < 0,05$ = signifikanter Unterschied der absoluten Zellzahlen)

D 1.3

Vergleich der Ergebnisse bei den CBL-Mäusen mit denen bei den NMRI-Mäusen (Abb. 38)

- Die Hauptwirkung des Milzextraktes: Leukopenie und Lymphodepression fanden sich grundsätzlich sowohl bei den gesunden NMRI- als auch bei den lymphadenotischen CBL-Tieren. Ein Unterschied läßt sich darin sehen, daß diese Wirkungen nach dreimaliger Injektion bei den NMRI-Tieren (vgl. C 4.2) abnahmen und zu einer entsprechenden, z.T. überschießenden Gegenregulation führten - bei den CBL-Tieren aber 42 Stunden nach dreimaliger Injektion sogar am stärksten ausgeprägt waren.
- Von den übrigen bei den NMRI-Tieren festgestellten Differentialblutbildveränderungen: teilweise leichte Vermehrung der stabkernigen und anfängliche Verminderung der segmentkernigen Granulozyten, dann Granulozytose und deren Überwindung, sowie der z.T. aufgetretene Anstieg der Monozyten ließen sich bei den lymphadenotischen Mäusen die anfängliche Granulozytose mit Linksverschiebung sowie die im folgenden relativ verlangsamte Produktion der stabkernigen Granulozyten nachweisen.
- Eine zusätzliche Wirkung des Milzextrakts im Sinne einer Hemmung der Produktion von Lymphoblasten konnte bei den CBL-Tieren nachgewiesen werden.

D 1.4.

Überlebensrate nach ME und nach 0,9% NaCl (Abb. 39)

Die Zahl der gestorbenen Tiere wurde jeweils zur gleichen Zeit zweimal am Tage ermittelt; danach wurde der Mittelwert des Sterbezeitpunktes in Stunden ab Tumortransplantation = Zeitpunkt 0 bestimmt. Den so erhaltenen mittleren Sterbezeitpunkt der einzelnen Kollektive zeigt Abb. 39:

		NMRI	CBL
LEUKOZYTEN		↓↓	↓↓↓
STAB- KERNIGE	8 Std. p.i.	↑	↑
	ab 24 Std. p.i.	↓	↓
SEGMENT- KERNIGE	8 Std. p.i.	↑	∅
	ab 24 Std. p.i.	∅	∅
LYMPHOZYTEN		↓↓	↓↓↓
MONOZYTEN		(↑)	∅

Abb. 3: Vergleich der hauptsächlichsten Wirkungen von Milzextrakt (5 g Äq ME/Tier, 2 x G 10) auf das periphere Blutbild von gesunden NMRI- und lymphadenotischen C-Bläusen.

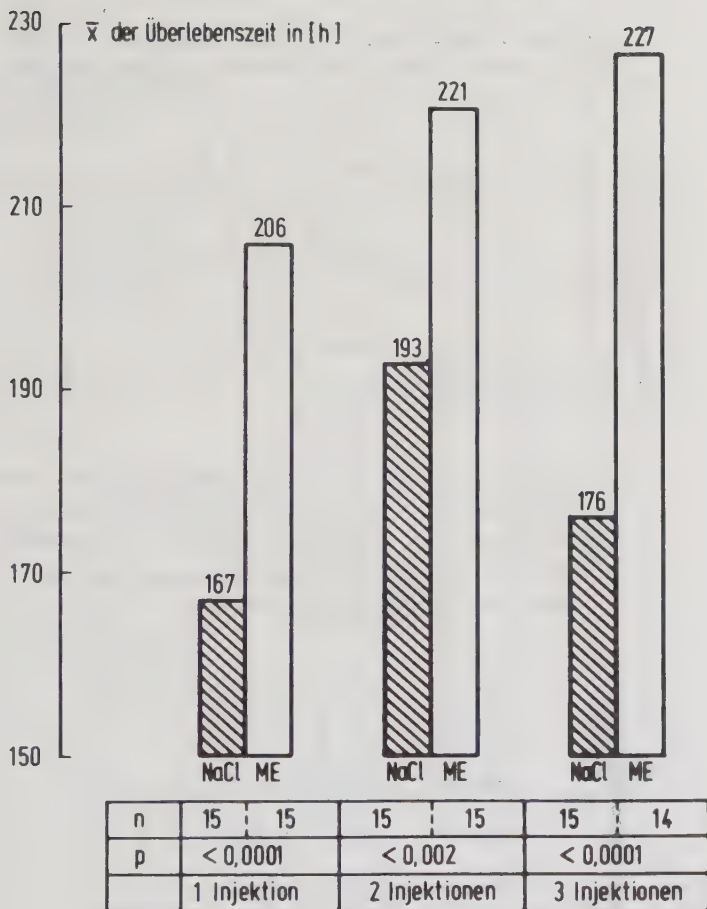


Abb. 39: Mittlerer Sterbezeitpunkt

lymphadenotomischer CBL-Mäuse (ab Tumortransplantation
= Zeitpunkt 0) nach 1, 2 und 3 Injektionen von 5 g/kg
ME/Tier im Vergleich zu 0,9% NaCl

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs zu
Versuchsbeginn

Daraus geht hervor, daß

1. jede ME-Injektion gegenüber der jeweiligen NaCl-Gruppe die Überlebenszeit signifikant verlängert:

eine Injektion	NaCl	(167 h $\pm$ 20)	$p < 0,0001$
	ME	(206 h $\pm$ 48)	
zwei Injektionen	NaCl	(193 h $\pm$ 46)	$p < 0,002$
	ME	(221 h $\pm$ 34)	
drei Injektionen	NaCl	(176 h $\pm$ 12)	$p < 0,0001$
	ME	(227 h $\pm$ 44)	

2. jede zusätzliche ME-Injektion gegenüber einer einmaligen Injektion eine Verlängerung der Überlebenszeit bedeutet, wobei die dreimalige Injektion die Überlebenszeit gegenüber der einmaligen signifikant erhöht:

ME	einmal	(206 h $\pm$ 48)	$p < 0,1$
	zweimal	(221 h $\pm$ 34)	
ME	zweimal	(221 h $\pm$ 34)	$p < 0,5$
	dreimal	(227 h $\pm$ 44)	
ME	einmal	(206 h $\pm$ 48)	$p < 0,02$
	dreimal	(227 h $\pm$ 44)	

Die prozentuale Verlängerung der Überlebenszeit nach ME-Injektion gegenüber den jeweiligen NaCl-Gruppen bringt Abb. 40 mit Beziehung a) auf den Zeitpunkt der Tumortransplantation und b) auf den Zeitpunkt des Therapiebeginns.

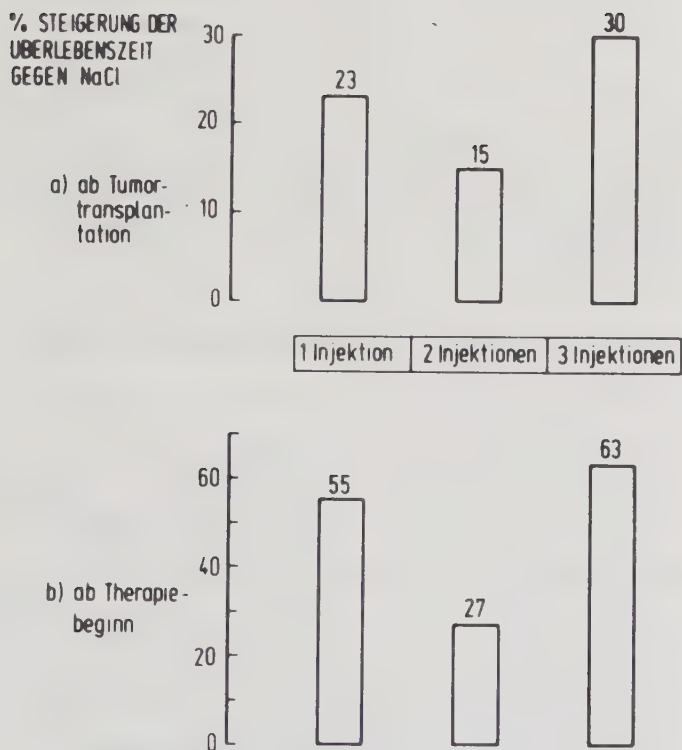


Abb. 40: Prozentuale Verlängerung der Überlebenszeit
lymphadenotischer CBL-Tiere nach ein- und mehrmaliger
Injektion von 5 g Äq ME/Tier gegenüber 0,9% NaCl
a) bezogen auf Tumortransplantation = Zeitpunkt 0
b) bezogen auf Therapiebeginn = 93 Stunden nach Tu-
mortransplantation.

Danach ergibt sich, daß Injektionen von jeweils 5 μ Äq ME/Tier (2 x G - 10, 2 Dialysen) die Überlebenszeit lymphadenotischer Mäuse um mehr als ein Drittel verlängern können, wobei zweimalige Injektionen (relativ zu 0,9% NaCl) schlechtere Ergebnisse als einmalige zeigen. Die besten Ergebnisse bringen die dreimaligen Injektionen (30 % Verlängerung der Überlebenszeit bezogen auf Tumortransplantationszeitpunkt bzw. 63 % bezogen auf Therapiebeginn).

b 1.5

Korrelation zwischen Blutbild und Überlebensrate

Ein strenger Vergleich Überlebenszeit - Blutbild bei den drei Kollektiven ist nicht möglich, da die Blutbilder zu verschiedenen Stadien der Krankheit angefertigt wurden (97, 121, 165 Stunden nach Tumortransplantation). Es fällt aber auf, daß z.B. die zweimal mit Milzextrakt behandelten Tiere, die im Vergleich mit der zugehörigen NaCl-Gruppe den relativ geringsten Anstieg der Überlebensrate zeigen, auch die relativ geringsten Veränderungen gegenüber der NaCl-Gruppe im Differentialblutbild zeigen. Im einzelnen ergibt sich:

- Bei Gruppe I fallen die Leukozyten nach Milzextrakt um ~ 25 % (vgl. Tab. 28):
Die Steigerung der Überlebensrate dieser Gruppe beträgt 55 % (ab Therapiebeginn).
- Bei Gruppe II fallen die Leukozyten nach Milzextrakt um ~ 16 % (vgl. Tab. 29):
Die Steigerung der Überlebensrate dieser Gruppe beträgt 27 % (ab Therapiebeginn).
- Bei Gruppe III fallen die Leukozyten nach Milzextrakt um ~ 39 % (vgl. Tab. 30):
Die Steigerung der Überlebensrate dieser Gruppe beträgt 63 % (ab Therapiebeginn).

D 2 W e i ß e s B l u t b i l d u n d Ü b e r -
l e b e n s r a t e n a c h M E, G - 25, fraktioniert
(vgl. S. 173 - 178)

D 2.1 Fraktionierung

Um zu sehen, welcher engere Molekulargewichtsbereich die unter D 1 nach Milzextrakt 2 x G - 10 beobachteten Blutbildveränderungen und die Steigerung der Überlebensrate hervorrief, wurde der Milzextrakt nach 2 Dialysen und 2 x G - 10 in einem G - 25 - Lauf gemäß der photometrischen Aufzeichnung (Abb. 41) in 5 Fraktionen unterteilt (Tab. 31):

	ml	MG
F I =	1 100 - 1 440	≥ 4 000 - 5 000
F II =	1 440 - 1 780	2 400 - 4 000
F III =	1 780 - 2 120	1 400 - 2 400
F IV =	2 120 - 2 600	1 000 - 1 400
F V =	2 600 - 3 040	700 - 1 000

Tab. 31: Fraktionierung bei Milz, G - 25
Mit Angabe des ungefähren Molekulargewichts
(vgl. Eichkurve G - 25, Abb. 4)

Der Versuchsaufbau erfolgte ähnlich dem Schema von D 1; demzufolge wurden alle Kollektive nach der Tumortransplantation (= Zeitpunkt 0) dreimal mit je 5 g Äq Milzextrakt bzw. 0,9% NaCl-Lösung behandelt. Die einmalige Blutbildkontrolle erfolgte 142 Stunden nach Tumortransplantation (entsprechend 24 Stunden nach der letzten Injektion, 48 Stunden nach Therapiebeginn). Zusätzlich wurde ein Kollektiv mit 3 x 5 g Äq gewaschener Kälbererythrozyten (nach 2 x G - 10 und 2 Dialysen) behandelt.

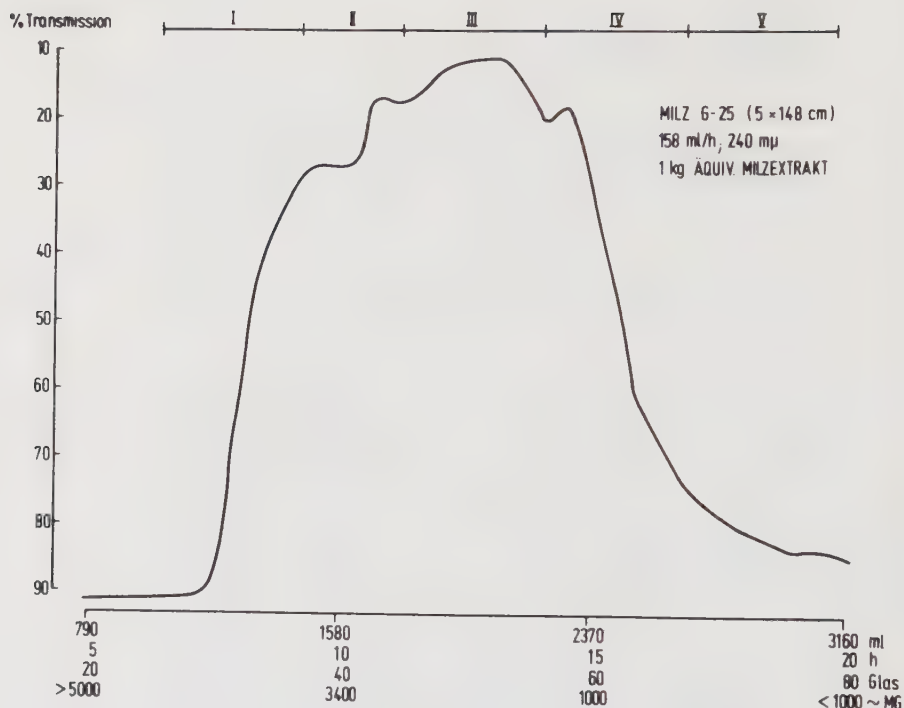


Abb. 41: Transmissionskurve von

M i l z G - 25 (5 x 150 cm, 158 ml/h;

Trennmedium 0,01 n $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; $\lambda = 240 \text{ m}\mu$).

Aufteilung in 5 Fraktionen

(Milzextrakt 2 x G 10, Dialysen 1 x 48 h, 1 x 20 h)

Weißes Blutbild

Die biologische Testung der einzelnen Fraktionen an mindestens je 10 Tieren ergab (vgl. Tab. 32): Die fraktionierten (und dadurch in ihrer Wirkung abgeschwächten) Extrakte beeinflussten das weiße Blutbild verhältnismäßig wenig. Einzig signifikante Senkung der Gesamtleukozyten trat nach F II auf (Molekulargewicht $\sim 4\ 000$, mittelmolekularer Bereich, vgl. auch C 3.1), die anderen Fraktionen waren von NaCl nicht signifikant zu trennen oder

	Leuko	stab	Segm	Lymph	Mono
I/NaCl	↑	ns	↑	ns	↑
II/NaCl	↓	ns	↓	ns	ns
III/NaCl	↑	↑	↑	ns	↑
IV/NaCl	ns	↑	ns	ns	↑
V/NaCl	ns	ns	ns	ns	ns
Ery/NaCl	ns	ns	ns	ns	ns

Tab. 32: Leukozytenzahl und Zahl der verschiedenen leukozytären Zellarten

↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Senkung nach 3 x 5 g Äq ME (2 x G - 10, 1 x G - 25; Fraktion I - V) gegenüber 0,9% NaCl.

(Zweiseitige Fragestellung, 5 % Niveau, ns = nicht signifikant)

erhöhten sogar (nicht signifikant) die Gesamtleukozytenzahl (F I und III). Im Differentialblutbild aller Fraktionen fällt vor allem das Fehlen der Lymphopenie auf (im Gegensatz zu D 1). Bei mehreren Fraktionen (I, III, IV) steigt die Zahl der Monozyten signifikant an. Die Erythrozyten-Injektionen verursachten keine von 0,9% NaCl unterscheidbaren Blutbildveränderungen.

Die insgesamt geringen Verschiebungen im weißen Blutbild lassen sich auf Extraktminderung durch Fraktionierung und auch darauf zurückführen, daß die nur einmalige Blutbildkontrolle (verglichen mit den dreimaligen Abnahmen unter D 1) schon in einem relativ frühen Krankheitsstadium erfolgt ist.

D 3

Überlebensrate

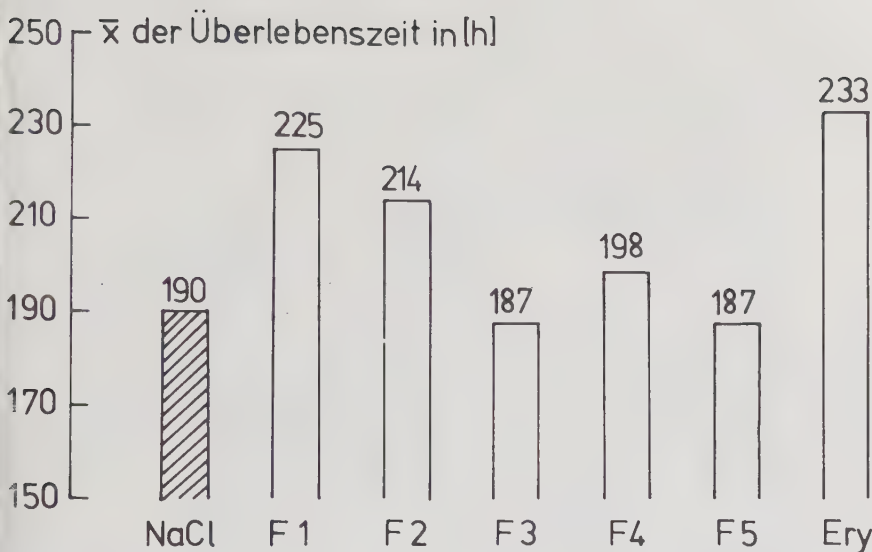
Die Überlebensrate der Tiere wurde wieder wie unter D 1 bestimmt und in Abb. 42 graphisch aufgetragen. Daraus ergibt sich, daß Fraktion I und II sowie die Erythrozyteninjektionen die Überlebenszeit gegenüber den NaCl-Tieren signifikant verlängerten und zwar:

Fraktion I	um 35 Stunden	($p < 0,002$)
Fraktion II	um 24 Stunden	($p < 0,05$)
Erythrozyten	um 43 Stunden	($p < 0,001$)

Dies entspricht einer prozentualen Verlängerung der Überlebenszeit (jeweils bezogen auf Zeitpunkt der Tumortransplantation bzw. Therapiebeginn) bei

Fraktion I	um ~19 %	bzw. ~37 %
Fraktion II	um ~13 %	bzw. ~25 %
Erythrozyten	um ~23 %	bzw. ~45 %

Danach ergibt sich, daß sich im Molekulargewichtsbereich um 4 000 (ähnlich wie bei der Leukozytensenkung unter C 3.1) hinsichtlich der Verlängerung



n	15	15	15	15	15	15	13
p	-	<0,002	<0,05	>0,5	<0,2	>0,5	<0,001
M I L Z E X T R A K T							

Abb. 42: Mittlerer Sterbezeitpunkt

lymphadenotischer CBL-Mäuse (ab Tumortransplantation = Zeitpunkt 0) nach 3 Injektionen von 5 g Äq ME/Tier (5 Fraktionen G - 25) bzw. 5 g Äq Erythrozyten/Tier (2 x G - 10, 2 Dialysen) im Vergleich zu 0,9% NaCl. n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs zu Versuchsbeginn.

der Überlebenszeit lymphadenotischer Mäuse wirksame Faktoren befinden. Stärkere Wirkungen ergaben sich bei der Zusammenfassung des ganzen Molekulargewichtsbereiches (700 - 20 000, vgl. D 1). Daneben zeigen auch mehrmals gewaschene und mit 2 x G - 10 und 2 Dialysen gereinigte (Külber-)Erythrozyten eine Erhöhung der Überlebensrate, aber keine fassbaren Blutbildveränderungen (obwohl ihre Präparation den gesamten Molekulargewichtsbereich umfaßte).

Gleichzeitig bei allen Kollektiven durchgeführte Hämoglobin-Messungen ergaben keinen Anhalt für anämisierende Effekte der Extraktinjektionen: der Mittelwert der Hb-Konzentrationen für das NaCl-Kollektiv betrug 16,1 g%, der Mittelwert aller übrigen Kollektive zusammen 16,3 g% - kein Einzelkollektiv unterschied sich signifikant vom NaCl-Vergleichskollektiv.

D 3

Überlebensrate nach Serum-
extrakt, G - 25, fraktioniert

Wie unter den Bedingungen von D 2 wurde im folgenden Versuch ein Serumextrakt hergestellt, photometrisch aufgetrennt (Abb. 43) und fraktioniert wie beim Milzextrakt (vgl. Tab. 31). Dann wurden die 5 Fraktionen auf eine mögliche Verlängerung der Überlebenszeit getestet.

Es ergaben sich (vgl. Abb. 44):

Alle Fraktionen (bis auf F V) verlängerten zwar die Überlebenszeit, eine statistisch signifikante Erhöhung der Überlebensrate ergab sich aber nur bei F IV:

|| um 34 Stunden gegenüber 0,9% NaCl, entspricht
|| einer prozentualen Verlängerung der Überle-
|| benszeit um ~15 % gerechnet ab Tumortrans-
|| plantation bzw. um ~24 % ab Therapiebeginn.

Das Molekulargewicht von F IV (~1 000) stimmt mit der auf das Blutbild der NMRI-Tiere wirksamen, niedermolekularen Serumfraktion von C3.1 überein.

Damit zeigen die Versuche mit Mäusen mit akuter lymphatischer Leukämie eine statistisch eindeutige und reproduzierbare Verlängerung der Überlebenszeit durch Serum- und vor allem durch Milzextrakte: a) besonders wirksam, auch hinsichtlich der nachgewiesenen Veränderungen im weißen Blutbild, unter Anwendung des (nicht fraktionierten) Gesamtextraktes (D 1), und b) bei Aufschlüsselung im Molekulargewichtsbereich um 4 000 wirksam beim Milzextrakt und im Molekulargewichtsbereich um 1 000 wirksam beim Serumextrakt.

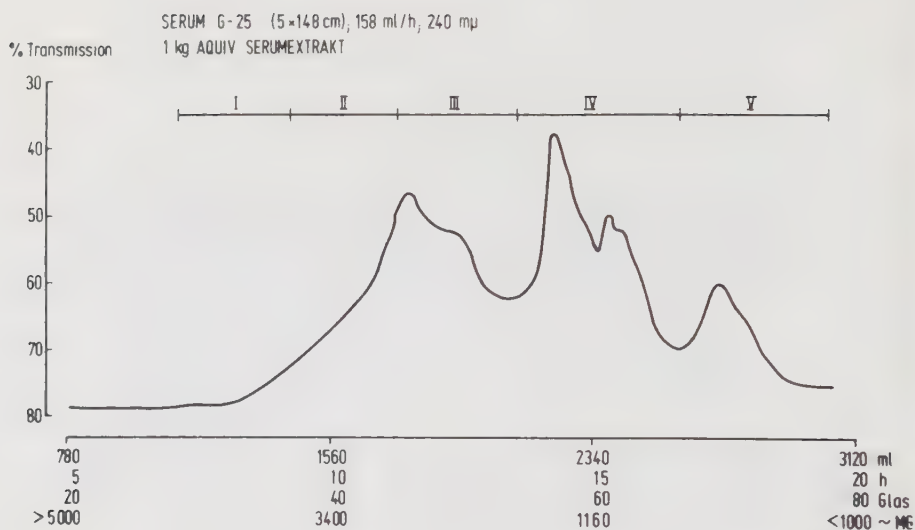
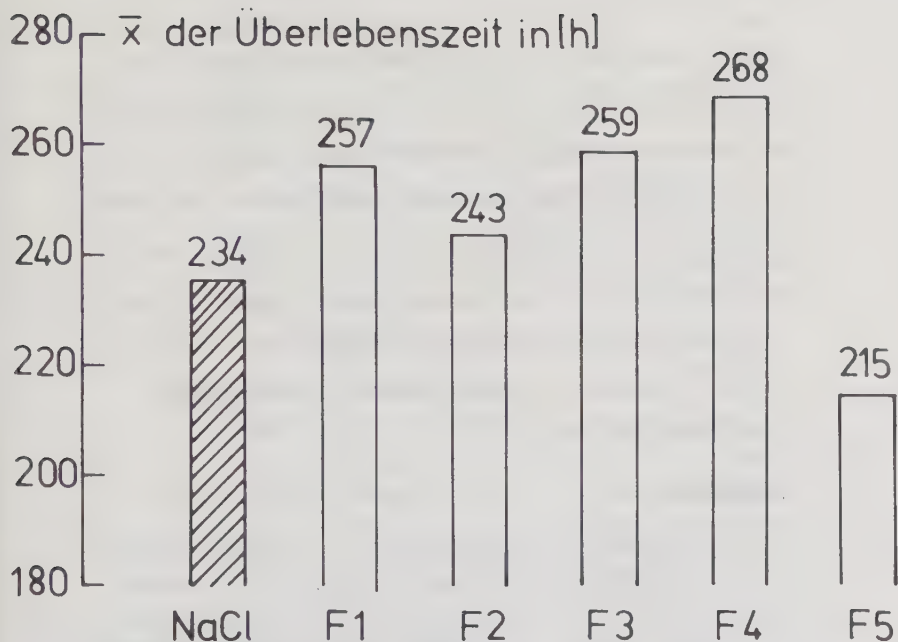


Abb. 43: Transmissionskurve von

S e r u m G - 25 (5 x 150 cm, 156 ml/h;
Trennmedium 0,01 n $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; $\lambda = 240 \text{ m}\mu$).

Aufteilung in 5 Fraktionen

(Serumextrakt 2 x G 10, Dialysen 1 x 48 h, 1 x 20 h)



n	14	14	15	15	16	12
p	-	<0,2	>0,5	<0,1	<0,02	<0,5
SERUMEXTRAKT						

Abb. 44: Mittlerer Sterbezeitpunkt

lymphadenotischer CBL-Mäuse (ab Tumortransplantation = Zeitpunkt 0) nach 3 Injektionen von 5 g/kg SE/Tier (5 Fraktionen G - 25) im Vergleich zu 0,9% NaCl.

n = Anzahl der Tiere des jeweiligen Kollektivs zu Versuchsbeginn.

E DISKUSSION

E 1 Unsere Untersuchungen über die Auswirkungen verschieden hergestellter und fraktionierter Kälbermilzextrakte auf das periphere weiße Blutbild gesunder NMRI-Tiere haben im wesentlichen ergeben: Injektion von Extrakten nach einer Dialyse (48 h) und zweimaliger Entsalzung (2 x G - 10; MG > 700 < 25 000) ergab folgende Änderungen des leukozytären Blutbildes (jeweils gegen 0,9% NaCl-Vergleichskollektive):

Leukozyten

- Einmalige Milzextraktinjektionen senken signifikant die Zahl der Leukozyten bei Blutabnahme in der 1., 2. und 4., 24., 48. und 96. Stunde. Die Ergebnisse nach Serumextraktinjektion entsprechen - etwas abgeschwächt - denen nach Milzextrakt.
- Die Wirkungen sind dosisabhängig (aber nicht linear): 10 g Äq ME senken die Gesamtleukozytenzahl signifikant stärker als 5 g Äq; ebenso verstärken und verlängern wiederholte Injektionen den Leukopenie-Effekt signifikant (bei ME und SE; bei ME allmählich stärkere Gegenregulation).

Stabkernige Granulozyten

- Einmalige Milzextraktinjektionen lassen nach einem kurzen initialen Abfall die Zahl der stabkernigen Granulozyten leicht ansteigen (8. Stunde, "Kurzzeiteffekt"); in der 24. Stunde p.i. bewegen sie sich im Normalbereich.

Der weitere Verlauf zeigt eine relativ verlangsamte Produktion der stabkernigen Granulozyten (Rechtsverschiebung) - als Hinweis auf eine mögliche antimitotische Extraktwirkung ("Langzeiteffekt"). Nach Serumextraktinjektion bleiben die stabkernigen Granulozyten weitgehend im Normbereich.

- Die Zellverschiebungen des Langzeiteffektes sind (bedingt) dosisabhängig; die Zahl der stabkernigen Granulozyten wird sowohl nach ME als auch nach SE bei erhöhten Dosen und wiederholten Injektionen stärker gesenkt.

Segmentkernige Granulozyten

- Einmalige Milzextraktinjektionen senken in der 1. und 4. Stunde die Zahl der segmentkernigen Granulozyten; sie führen aber in der 8. Stunde zu einer starken Granulozytose (mit Linksverschiebung); in der darauffolgenden Zeit normalisieren sich die Zellzahlen. Serumextraktinjektionen zeigen ähnliche Verhältnisse; allerdings fehlt der anfängliche Abfall sowie die Linksverschiebung bei der Granulozytose.
- Die Zellverschiebungen sind wenig dosisabhängig.

Eosinophile Granulozyten

- Wegen der geringen Zellzahlen der eosinophilen Granulozyten sind statistisch eindeutig abzusichernde Aussagen über ihr Verhalten nach Milzextrakt- und Serumextraktinjektionen nicht möglich. Nach einer leichten Senkung pendeln sich die Zellzahlen offensichtlich auf hochnormale Werte ein (ab 8. Stunde).
- Wiederholte Injektionen oder eine erhöhte Dosis scheinen die Zellzahlen nicht zu ändern.

Lymphozyten

- Einmalige Milzextraktinjektionen führen gleich ab der 1. Stunde zu einer langandauernden, auch in der 96. Stunde noch nicht normalisierten Lymphopenie. Die Ergebnisse nach Serumextraktinjektion entsprechen - etwas abgeschwächt - denen nach Milzextrakt.
- Die Lymphopenie ist stark dosisabhängig und nimmt bei vermehrten Injektionen entsprechend zu - ähnlich wie bei der Zahl der Gesamtleukozyten.

Monozyten

- Einmalige Milzextraktinjektionen führen ab der 8. Stunde zu einem langsamen Anstieg der Zahl der Monozyten; Serumextraktinjektionen verändern die Monozytenzahl nicht aus dem Normalbereich.
- Wiederholte ME-Injektionen führen zu einem geringeren Anstieg, wiederholte SE-Injektionen zu einem stärkeren Anstieg als die jeweiligen einmaligen Injektionen.

Diese Befunde waren mit nichtfraktionierten Milz- und Serumextrakten erhoben worden; Fraktionierungen innerhalb des Molekulargewichtsbereiches $> 700 - 25\,000$ zeigten drei wirksame Gipfel:

- a) Für Milz- und Serumextrakt ein höhermolekularer Bereich (6 000 - 8 500)
- b) Für den Milzextrakt ein mittelmolekularer Bereich ($\sim 4\,000$)
- c) Für Milz- und Serumextrakt ein niedermolekularer Bereich ($\sim 1\,000$).

Dazwischenliegende Bereiche - ein wichtiger Befund - erwiesen sich als unwirksam: sie veränderten sowohl die Gesamtzellzahlen auch das Differentialblutbild nicht und entsprachen somit einer Injektion von physiol. NaCl-Lösung. Die Blutbildveränderungen waren abhängig vom Grad der Fraktionierung (Extraktminderung bei Aufsplitterung der Wirkungsbreite): wurden alle drei Bereiche zusammengefaßt (Vollextrakte), ergab sich die stärkste Wirkung.

Die Veränderungen des Blutbildes lassen sich in drei Gruppen untergliedern:

- a) 1. und 2. Stunde p.i. eine initiale Erniedrigung aller Zellzahlen.
- b) 2. bis 8. Stunde p.i. eine Lymphopenie und daraus resultierende Leukopenie sowie Granulozytose mit Linksverschiebung ("kurzzeit-effekt").
- c) ab 8. bis 96. Stunde p.i. weiterhin Lymphopenie mit Leukozytose; Normalisierung der Zahl der segmentkernigen Granulozyten und verminderte Proliferation der stabkernigen Granulozyten (Rechtsverschiebung); Anstieg der Monozyten ("Langzeiteffekt").

Die wesentliche Extraktwirkung scheint nicht in erster Linie der initiale Abfall aller Zellzahlen, sondern - neben dem Kurzzeiteffekt - vor allem der mindestens 4 Tage feststellbare Langzeiteffekt mit langdauernder Lymphopenie und Senkung der Gesamt-leukozytenzahl zu sein.

Unsere Untersuchungen ergaben bei den CBL-Tieren mit akuter lymphatischer Leukämie:

- a) Die bei den lymphadenotischen Mäusen nach Milzextrakt (2 x G - 10, 2 Dialysen) durchgeführten Blutbildkontrollen zeigten die Bestätigungen der Hauptwirkungen bei den NMRI-Tieren mit Lympho- und entsprechender Leukopenie. Ein Unterschied läßt sich darin erkennen, daß diese Wirkungen nach mehrmaligen Injektionen bei den NMRI-Tieren zwar zuerst verstärkt auftraten, dann aber zu einer entsprechenden Gegenregulation führten - bei den CBL-Tieren aber 42 Stunden nach dreimaliger Injektion sogar am stärksten ausgeprägt waren.
Die Neuproduktion von Lymphoblasten war unter ME verlangsamt.
- b) Von den übrigen bei den NMRI-Tieren festgestellten Differentialblutbildveränderungen ließ sich bei den lymphadenotischen Mäusen die relativ verlangsamte Produktion der stabkernigen Granulozyten nachweisen.
- c) Die Injektionen verlängerten die Überlebenszeit der Tiere signifikant: 1 Injektion um 55 % (gerechnet ab Therapiebeginn), 2 Injektionen um 27 %, 3 Injektionen um 63 % gegenüber den NaCl-Vergleichstieren.
- d) Die Verlängerung der Überlebenszeit korreliert mit der Senkung der Leukozyten; d.h. je stärker der Milzextrakt die Leukozyten (relativ) senkte, umso länger lebten die Tiere.
- e) Fraktionierungen mit G - 25 in vier Molekulargewichtsbereiche ergaben:
Die Extraktfraktionierung führte (bei nur einmaliger Blutbildkontrolle) sowohl nach ME

als auch nach SE nur zu mäßigen Veränderungen im peripheren Blutbild. Hinsichtlich der Verlängerung der Überlebenszeit wirksame Fraktionen waren (neben einem Erythrozytenextrakt, der aus unbekannten Gründen auch Wirkungen zeigte) beim Milzextrakt Fraktion I und II ($MG \sim 4\,000$), beim Serumextrakt Fraktion IV ($MG \sim 1\,000$). Diese Molekulargewichtsbereiche entsprechen jeweils wirksamen Fraktionen bei den NMRI-Tieren. Die Verlängerung der Überlebenszeit war nicht so ausgeprägt wie beim unfractionierten Milzextrakt.

Damit bestätigen unsere Versuche verschiedene der eingangs (A 2.4) erwähnten Beobachtungen bei der Anwendung von Milzextrakt: Leukopenie, Lymphopenie, evtl. Granulopoese fördernder Faktor (Kurzzeit) und Hemmung der Produktion der stabkernigen Granulozyten (Langzeit) sowie eine statistisch eindeutige Verlängerung der Überlebenszeit bei akuter lymphatischer Leukämie. Unsere Ergebnisse hinsichtlich der Blutbildveränderungen wurden sowohl bei kurzzeitigen Blutabnahmen als auch bei wiederholten Kontrollen über einen längeren Zeitraum gewonnen - was wichtig erscheint, da eine einmalige Kontrolle über die dynamischen Veränderungen des Blutbildes nur wenig aussagt.

E 2

Nun soll eingegangen werden auf die Frage, inwieweit mögliche unspezifische Einflüsse unseren Beobachtungen ähnliche Blutbildveränderungen hervorrufen können.

Pyrogene:

Da unsere Extrakte zwar bakteriologisch steril, aber unter unsterilen Bedingungen hergestellt wurden, kann nicht mit Sicherheit das Vorhandensein pyrogener Stoffe (die erwiesenermaßen Blutbildveränderungen verursachen) ausgeschlossen werden:

- Bekannt ist, daß die Injektion zahlreicher unspezifischer Stoffe, auch ganz verschiedene Organextrakte (durch Arbeiten in unserem Labor bestätigt) z.T. umfangreiche Leukozytenbewegungen auslösen (Zusammenstellung bei KOMIYA 83).
- MENKIN (93) wandte 1940 einen Stoff an (wahrscheinlich Globuline), der - i.p. injiziert - zu einer Leukozytose und zu einer lokalen Entzündung führte (LPF).
- MOESCHLIN (95) beschrieb 1945 das Verhalten der Leukozyten nach Injektion von "Pyripher oder anderen Fieber erzeugenden Mitteln": seine Leukozytenkurve zeigte kurz nach der Injektion einen Abfall, dann innerhalb von 3 bis 6 Stunden einen Anstieg infolge der Vermehrung der segmentkernigen Granulozyten ("Ausschwemmungsphase") und noch einen weiteren Anstieg bis zu 8 Stunden durch Vermehrung der stabkernigen Granulozyten ("Produktionsphase"). Der relative Granulozytenanstieg war abhängig von der Höhe des Ausgangswertes.
- Ähnliche, aber nicht einheitliche Ergebnisse, fand 1962 STREICHER (128) nach Pyripher-Injektionen bei Ratten.
- HARRIS (65) wandte 1965 den Menkin'schen LPF-Faktor bei Meerschweinchen an und fand eine Granulozytenausschwemmung aus dem Knochenmark;

im Knochenmark zeigte sich eine Verminderung der myeloischen Zellen und eine Zunahme der Lymphozyten.

- WESTPHAL (138) erzeugte 1952 mit Spaltprodukten pyrogener Stoffe aus gramnegativen Keimen (Polysaccharide und Proteine, MG 1 000 - 3 000) Leuko- und vor allem Lymphopenien (manchmal aber auch Leukozytosen).
- Dagegen riefen Injektionen pyrogenartiger Stoffe nach KELLER (79) im allgemeinen Leukozytosen hervor, ebenso HEILMEYER (69), der 1955 betont, daß nach spätestens 24 Stunden die normalen Werte vor Injektion wieder erreicht sind. (Aufgehoben sind solche Reaktionen bei verschiedenen Knochenmark-, aber auch Milz- und Lebererkrankungen, vgl. HEILMEYER 69, und LINKE 89).
- Schließlich fand 1956 SPIERS (124) bei verschiedenen Antigen-Injektionen (z.B. Pollen bei Pollen-sensibilisierten Mäusen) nur eine mäßige Blutbildbeteiligung (leichte Neutrophilie, leichter Anstieg der Lympho- und Monozyten).
- Interessant sind die Rattenversuche von HAUBS (66) 1971: drei ganz verschiedene Reize (Toxininjektion, emotionaler Reiz, artifizieller Knochenbruch) führten zur Einschwemmung einer großen Zahl von jungen mononukleären Zellen ins Blut sowie zur Emigration mononukleärer Zellen in die Gewebe; die Toxininjektion führte zusätzlich zur Leukozytose.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Wirkung unspezifischer, pyrogener Stoffe nicht einheitlich zu sein scheint: es werden sowohl Leukozytosen als auch Leukopenien und z.T. unterschiedliche Befunde im Differentialblutbild beschrieben (eventuell je nach

Polysaccharid- und Proteinanteil). Die Wirkung scheint jedoch immer nach spätestens 24 Stunden wieder abgeklungen zu sein.

Endokrine Regulationsmechanismen:

Die Milz- und Serumextrakte (die sich dann von anderen Organextrakten nicht unterscheiden würden) könnten als exogener Reiz endogene Regulationsvorgänge auslösen, die ihren summarischen Ausdruck im Blutbild finden:

- Die Auswirkungen verschiedener Reize sind vom Zustand des endokrinen Systems abhängig: so fand 1961 GORDON (51) die nach Injektion von Typhusvakzine beobachtete Leukopenie bei hypophysektomierten oder adrenaletomierten Tieren aufgehoben.
- WESTPHAL (138) untersuchte 1952 bei seinen bakteriellen Injektionen auch die Einflüsse von Hypophyse und NNR-Regelkreis: Pyrogenartige Injektionen riefen nicht nur Leukopenien (manchmal Leukozytosen; Lymphopenien immer) hervor, sondern nach anfänglich kurzem Anstieg nahm auch die Konzentration der freien Corticoide im Plasma ab (verminderte Glucocorticoide müßten zu einer Verminderung der Granulozyten, Vermehrung der zirkulierenden Lymphozyten und der Eosinophilen führen, vgl. GANONG 50).
- Wenn die Extrakte - mehr oder minder unspezifisch - das NNR-System (direkt oder über ACTH-Freisetzung) stimulieren könnten (vgl. HAJOS 61), so würde daraus auch eine Neutrophilie und Lymphopenie resultieren (vgl. WHITE 141).

- Die Arbeitsgruppe um KAISER und RINDT (76 - 78) ging 1964 der Frage nach, inwieweit Milzextrakte den Metabolismus verschiedener Hormone beeinflussen: ähnlich wie WESTPHAL fanden sie (trotz exogener ACTH-Zufuhr) eine Abnahme der Plasmacorticosteroide (was dann zur sekundären Lymphozytenvermehrung führt). Für die Verminderung der Corticosteroide (die z.B. nach Lungenextrakt nicht auftrat) wird eine Hemmung der NNR-Produktion (über HVL) oder ein Mehrverbrauch im aktivierten RES diskutiert (diese Aktivierung soll durch Metaboliten des Milzextraktes, Nukleotide und Nukleoside, hervorgerufen werden).

Stress:

Reize, die eine gesteigerte ACTH-Sekretion hervorrufen ("Stressoren" nach SELYE 121) führen über Catecholamin- und Glucocorticoidausschüttung zur bekannten Stressreaktion, die im Blutbild folgenden Verlauf nimmt (vgl. HARLOW und SELYE 64; GORIZONTOV 52; SCHILLING 116):

- gleich nach Einwirkung des Stressors ein Abfall der Gesamtleukozyten (Vorphase oder Alarmreaktion)
- nach 1 - 2 Stunden Neutrophilie
- im weiteren Verlauf (~ 8 h) Lympho- und Eosinopenie, wobei die Gesamtleukozytenzahl auf Grund der anhaltenden Neutrophilie i.a. noch erhöht ist (Kampfphase nach SCHILLING, Resistenzphase nach SELYE)
- Normalisierung nach spätestens 24 Stunden mit Anstieg der Lymphozyten und Eosinophilen und mit Absinken der erhöhten Gesamtleukozyten

durch Abfall der Neutrophilen (Heilphase nach SCHILLING, Ermüdungsphase nach SELYE).

Ähnliche Verläufe nach Stress werden immer wieder beschrieben; das besondere Verhalten der Lymphozyten untersuchte dabei 1953 DOUGHERTY (35), der eine Normalisierung der Blutbildreaktion auf Stress schon nach 240 min sah, wobei die - auch bei der normalen Maus vorhandenen - "Stresslymphozyten" (groß mit schwach basophilem Zytoplasma) nicht signifikant anstiegen.

3

Trotz der angeführten möglichen unspezifischen Ursachen unserer Milz- und Serumextraktwirkungen scheinen folgende Tatsachen die spezifische Wirkung dieser Extrakte zu belegen:

- Durch Pyrogene hervorgerufene Leuko- und Lymphopenien sind i.a. nach spätestens 24 Stunden normalisiert: unsere Untersuchungen zeigen statistisch signifikante Extrakteffekte noch nach 4 Tagen. Die Lymphopenie tritt in unseren Untersuchungen dann erst am stärksten auf, wenn die Pyrogenwirkung vorbei sein müßte. Außerdem werden nach Pyrogeninjektionen auch häufig Leukozytosen beschrieben, was in unseren Untersuchungen nie auftrat. Da aber das Vorkommen pyrogenähnlicher Substanzen in den Extrakten nicht (mit Sicherheit) auszuschließen ist, kann der anfängliche Zellabfall (1. Stunde) auch durch die (Mit-)Wirkung solcher Stoffe verursacht sein.
- Pyrogeninjektionen führen meist zu Begleiterscheinungen (z.B. Fieber, lokale Entzündung):

unsere Versuchstiere zeigten kein von den NaCl-Tieren unterscheidbares Verhalten.

- Injektionen als "Stress" schließen auch die NaCl-Gruppen mit ein: unsere Ergebnisse wurden aber mit statistisch eindeutig zu sichernden Unterschieden zu den jeweiligen NaCl-Gruppen gewonnen.
- Die eher leichte Erhöhung der eosinophilen Granulozyten spricht gegen Stress oder andere ACTH-Stimulierung.
- Die Neutrophilie nach Stress ist von keiner Linksverschiebung begleitet: unsere Untersuchungen zeigen in der 8. Stunde beim Milzextrakt eine Linksverschiebung (Granulopoese fördernder Faktor).
- Beim Stress ist die Gesamtleukozytenzahl während der Lymphopenie durch die Neutrophilie erhöht: unsere Untersuchungen zeigen gleichzeitig eine starke signifikante Leukopenie.
- Auch beim Stress tritt, wie nach Pyrogeninjektion, spätestens nach 24 Stunden i.a. die Normalisierung ein: unsere Beobachtungen zeigen signifikante Effekte nach 4 Tagen.
- Stress (oder Pyrogene) müßten alle unter gleichen Bedingungen hergestellten Extrakte betreffen: unsere Untersuchungen zeigen, daß nur bestimmte Molekulargewichtsbereiche Wirkungen ergeben, die anderen Bereiche unterscheiden sich nicht von einer sterilen NaCl-Injektion.
- Schließlich sind die statistisch gesicherten Therapieerfolge bei akuter lymphatischer Leukämie durch unspezifischen Einfluß nicht zu erklären.

Demnach zeigt der Ablauf unserer Leukozytenkurven und das Verhalten der Differentialblutbilder ein von den Reaktionen nach Pyrogeninjektion oder stressbedingter ACTH-Ausschüttung deutlich differentes Verhalten. Als Ursache für die Extraktwirkungen kann somit das Vorhandensein humoraler Faktoren der Milz weiterhin erwogen werden.

E 4 Über die chemische Natur der von uns untersuchten Milz- und Serumextrakte können folgende Aussagen gemacht werden:

- Die Stoffe sind gut wasserlöslich
- dialysabel (MG < 20 000)
- sie kommen in (mindestens 3) verschiedenen Molekulargewichtsbereichen vor (~ 1 000, ~ 4 000, 6 000 - 8 500)
- sie sind hitzelabil (> 80° C keine Extraktwirkung)
- es handelt sich vermutlich um Peptide oder Verbindungen mit Peptiden in der wirksamen Gruppe (Wirkungsverlust durch Peptidasen, in unserem Labor Pronase, vgl. SCHÜRENBERG 120)
- die Stoffe zeigen ein Peptiden entsprechendes UV-Absorptionsmaximum.

E 5 Da unsere Untersuchungen sich auf die unphysiologische Injektion von Extrakten beschränkten, können wir die Frage, welche Rolle die Stoffe unter physiologischen Bedingungen spielen und unter welchen Einflüssen und Mechanismen sie in vivo entstehen, nicht beantworten. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Versuche von KOMIYA (83):

Er untersuchte die Abhängigkeit des peripheren Blutbildes und dessen Beeinflussung durch Milzfaktoren im Hinblick auf die Intaktheit des Nervensystems, vor allem des n.vagus und n.splanchnicus. Unter dem Einfluß dieser (blutregulierenden) Nervenäste werden offensichtlich in der Leber und Milz - je nach Reiz verschiedene - (Hämo-)Poetine gebildet, die dann ihrerseits als humorale Wirkstoffe das Blutbild beeinflussen.

E 6

Zum Problem, wo letztlich der Angriffsort der von uns untersuchten Substanzen zu suchen ist und wie der Wirkungsmechanismus dieser Stoffe zu erklären ist, liegen in der Literatur verschiedene Theorien und Hinweise vor:

- v. ALBERT (2 - 6) sah (zuletzt 1969) einen direkten Einfluß dieser Stoffe auf den Stoffwechsel der Leukozyten mit Proliferations- und Reifungshemmung durch Hemmung der Tetrahydrofolat-Formylase und Oxymethyltetrahydrofolat-Dehydrogenase (C-1 - Stoffwechsel der Zellkerne).
- Verschiedentlich wird ein direkter Einfluß der Stoffe auf das Knochenmark angenommen: GOSTOMZYK (54) erklärte 1954 die Granulozytose durch humorale Stimulierung der Ausschwemmung der Granulozyten aus dem Knochenmark (ebenso HARRIS 65, der auch die Lymphopenie durch Zellverschiebung ins Knochenmark erklärt). Nach FRESEN (49) dämpfen die humoralen Faktoren die Neuproduktion im Knochenmark; nach KNOSPE (82) scheint nach Röntgenbestrahlung ein prolife-

rationsstimulierender Faktor die Granulozytose hervorzurufen (größere Ausreifungstendenz bei Leukämien).

- LOZZIO (91) begründet 1972 die Zerstörung leukämischer Zellkulturen durch Milzextrakt mit einer Synthesehemmung der RNA.
- Auch ESPOSITO (41) prüfte 1964 leukämische Zellkulturen unter Milzextrakt und nahm an, daß der RNA-Gehalt des Milzextraktes die Stoffwechseländerung in den Zellkulturen hervorrief.
- Ähnliches kann bei den Extraktanwendungen an Tieren mit akuter lymphatischer Leukämie diskutiert werden (1966 SKALKA 123; 1967 SWINGLE 130): Knochenmarkzellen einer akuten Leukämie verbrauchten in einer Suspension RNA-haltigen Milzextraktes signifikant mehr Sauerstoff als normale Tumorzellen. Diese Stoffwechseländerung soll dadurch geschehen, daß durch den RNA-Einbau aus normalem lymphatischem Gewebe eine normale Informationsübertragung innerhalb der zuerst maligne entarteten Zellen möglich wird.
- KÄLSER u.a. (76 - 78) sahen eine Wirkung der Milzextrakte über den HVL-NMR-Regelkreis mit Beeinflussung des Plasmacorticoid-Haushaltes.
- Exakte Hinweise existieren für eine Mitosehemmung durch die humoralen Stoffe (1966 DALOS 30; 1963 MAURICE 92 und 1968 SCHOEN 119 sahen dies vor allem nach Röntgenbestrahlung).
- Die humoralen Stoffe könnten als (Auto-)Antikörper Thrombozyten und andere Zellen mit entsprechenden Antigeneigenschaften binden und dadurch deren Zahl reduzieren (1956 LAUDA 87; 1972 POGGLITSCH 104).
- Zellverschiebungen unter Extraktwirkung in andere Gewebe ist denkbar (1971 HAUSS 66).

- Sicher tritt die Lymphopenie jedenfalls nicht durch Ansammlung der Lymphozyten am Reizort (= Bauchhöhle) auf (1956 SPEIRS 124).
- Das Splenin A, 1945 von UNGAR (134) postuliert, soll als humoraler Faktor die Resistenz der Blutgefäßwand hinsichtlich der Diapedese korpuskulärer Blutelemente erhöhen und so den Übertritt von Zellen aus dem Knochenmark in die Blutbahn erschweren.
- Auch AUINGER (11) unterstützte 1957 die These der Kapillarresistenzerrhöhung durch Milzextrakt.

Auf Grund unserer Untersuchungen können wir noch nicht entscheiden, welche These letztlich und ob nur eine allein die richtige ist. Wahrscheinlich gemacht werden kann nach unseren Befunden ein die Granulozytenausschüttung fördernder Faktor mit Entleerung des Knochenmarks und vermehrtem Auftreten segmentkerniger und z.T. stabkerniger Granulozyten (8. Stunde). Für die spätere Verminderung der stabkernigen Granulozyten (Rechtsverschiebung) kann ein die Mitose hemmender Faktor angenommen werden. Die Ursache der Lymphopenie (und der daraus resultierenden Leukopenie) kann in der 1. Stunde durchaus pyrogener Natur sein - bei den eigentlichen Kurzzeiteffekten und bei den Langzeitbeobachtungen, gerade auch bei den lymphadenotischen Mäusen, müssen Wirkungen auf die Lymphozyten selbst angenommen werden (evtl. Mitosehemmung). Diskutiert werden kann die Frage, inwieweit bei den malignen Lymphozyten Milzextrakteinflüsse auf Interferon (vgl. 1973 GRESSER 56; 1970 WHELOCK 140; 1972 HELLMANN 70)

oder Wirkungen ähnlich wie Interferon (1965 McKENZIE 80) eine Rolle spielen, oder ob Milzextrakte in irgendeiner Weise auf den veränderten Generationszyklus der abnormen Zellen einwirken (vgl. 1968 HAVEMANN 67).

Somit zeigen unsere Untersuchungen das Vorhandensein leukozytenwirksamer Substanzen in bestimmten Molekulargewichtsbereichen von Kälbermilzextrakten, die offensichtlich an das Serum weitergegeben werden (weitgehend ähnliche Wirkungen unserer Serumextrakte). Bei den beschriebenen verschiedenartigen Extraktwirkungen kann das Vorkommen mehrerer Stoffe angenommen werden - es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um Spaltprodukte eines einzigen Stoffes handelt. Die Extrakte entstammen normalen und nicht hypersplenischen Milzen, denen - wie verschiedene Untersuchungen zeigen - keine verstärkte humorale Aktivität zugrunde liegt. Die Stoffe führen im peripheren Blutbild normaler NMRI-Tiere und lymphadenotischer GBL-Tiere zu distinktierten, statistisch von stets aufgestellten NaCl-Vergleichsgruppen eindeutig zu trennenden Reaktionsmustern, die sich auch von den nach Pyrogeninjektionen oder im Stress-ACTH-Regelkreis hervorgerufenen Veränderungen deutlich unterscheiden. Bei der Behandlung der Tiere mit akuter lymphatischer Leukämie konnten statistisch eindeutig zu sichernde und hinsichtlich der Verlängerung der Überlebenszeit

der Tiere beachtenswerte Therapieerfolge erzielt werden.

Zukünftige Untersuchungen werden zeigen müssen, ob und inwieweit die von uns beschriebenen Stoffe Eingang in die Therapie menschlicher Leukämien finden können. Auch muß es weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, nähere Informationen über die biochemische Struktur, den Wirkungsmechanismus und die Stimuli der physiologischen Ausschüttung dieser Stoffe zu erfahren.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Problem der humoralen Regulation des weißen Blutbildes durch die Milz. Nach einer Übersicht über wahrscheinliche und gesicherte Funktionen der Milz werden zahlreiche Hinweise in der Literatur angegeben (nach Splenektomie; Hypersplenismus sowie Extraktanwendungen), die eine humorale Milzbeteiligung bei der Regulation des leukozytären Blutbildes als sehr wahrscheinlich erscheinen lassen.

Deshalb haben wir versucht, mit der Anwendung von wässrigen, weitgehend eiweißfreien Kälbermilz- und Serumextrakten Teilfunktionen der Milz zu untersuchen. Die biologische Testung dieser verschiedenen hergestellten und z.T. mit Gelchromatographie (Sephadex-Säulen-Chromatographie) unterschiedlich fraktionierten Extrakte ergab bei gesunden NMRI-Tieren und bei CBL-Mäusen mit akuter lymphatischer Leukämie gegen jeweils neu aufgestellte NaCl-Vergleichskollektive statistisch eindeutig zu sichernde Ergebnisse:

- 1) In der 1. und 2. Stunde p.i. eine initiale Erniedrigung aller Zellzahlen
- 2) In der 2. - 8. Stunde p.i. eine massive Lymphopenie (und daraus resultierende Leukopenie) und Granulozytose mit Linksverschiebung ("kurzzeiteffekt")
- 3) Ab der 8. - 96. Stunde p.i. als "langzeiteffekt" weiterhin Leuko- und Lymphopenie, mit Normalisierung der segmentkernigen Granulozyten und erniedrigter Zahl der stabkernigen Granulozyten.

Bei den leukämischen CBL-Tieren war die Zahl

der Lymphoblasten relativ zur NaCl-Gruppe vermindert.

Die Monozyten stiegen bei den NMRI-Tieren langsam an.

Die Ergebnisse nach Serumextraktinjektion entsprachen weitgehend denen nach Milzextraktgabe; dies widerspricht nicht der Hypothese, daß humorale Faktoren der Milz ins Serum gelangen.

Die Fraktionierungen mit verschiedenen Sephadex-Gel-Typen ergaben drei wirksame Molekulargewichtsbereiche:

- a) für Milz- und Serumextrakt ein höhermolekularer Bereich (6 000 - 8 500)
- b) für den Milzextrakt ein mittelmolekularer Bereich ($\sim 4\ 000$)
- c) für Milz- und Serumextrakt ein niedermolekularer Bereich ($\sim 1\ 000$).

Bei den Tieren mit akuter lymphatischer Leukämie brachten die Extraktinjektionen eine (dosisabhängige) Verlängerung der Überlebenszeit, maximal um 63 % gegenüber der NaCl-Gruppe.

Nach der Diskussion möglicher unspezifischer Ursachen für die aufgezeigten Extraktwirkungen (Pyrogene; Stress; endokrine Regulationsmechanismen) werden Kriterien für die spezifische Wirkung der Extrakte angegeben. Es kann demzufolge die Hypothese aufrechterhalten werden, daß für die geschilderten Extraktwirkungen humorale Faktoren der Milz ursächlich eine Rolle spielen.

Die wirksamen Stoffe (oder Spaltprodukte einer Substanz) erwiesen sich als wasserlöslich, dialysabel und

hitzelabil. Die Extrakte zeigten eine Peptiden entsprechende UV-Absorption.

Der Frage, wie der Wirkungsmechanismus dieser Stoffe letztlich zu erklären ist, wird mit Gegenüberstellungen aus der Literatur nachgegangen; nach unseren Befunden kann lediglich wahrscheinlich gemacht werden:

- ein die Granulozytenausschüttung fördernder Faktor mit Entleerung des Knochenmarks und vermehrtem Auftreten segmentkerniger und stabkerniger Granulozyten (Kurzzeiteffekt)
- ein die Mitose hemmender Faktor bei der späteren Verminderung der stabkernigen Granulozyten (Langzeiteffekt)
- ein auf die Lymphozyten gerichteter evtl. anti-mitotischer Faktor (bei langdauernder Lymphopenie, vor allem bei den CBL-Tieren).

Diese Arbeit zeigt somit das Vorhandensein leukozytenwirksamer Substanzen in bestimmten Molekulargewichtsreichen von Kälbermilz- und Serumextrakten. Die Extrakte führen bei NMRI-Mäusen und lymphadenotischen CBL-Mäusen zu statistisch gesicherten, von den NaCl-Vergleichsgruppen und Pyrogen- oder ACTH-abhängigen Reaktionen stets zu trennenden Blutbildveränderungen. Die Erfolge bei der Behandlung der Tiere mit akuter lymphatischer Leukämie lassen die Hoffnung berechtigt erscheinen, daß weitere Untersuchungen zur Klärung der Frage unternommen werden, ob und inwieweit die geschilderten Stoffe Eingang in die Therapie menschlicher Leukämien finden können.

T A B E L L A R I S C H E R A N H A N G

Die folgenden Abbildungen zeigen die Häufigkeitsverteilungen der einzelnen Kollektive - exemplarisch angegeben bei den Versuchen C 1, C 2, C 3.2, D 1 und D 2.

Auf der Ordinate sind die absoluten Häufigkeiten aufgetragen, auf der Abszisse die Klassengrenzen.

Die Klassengrenzen sind angegeben

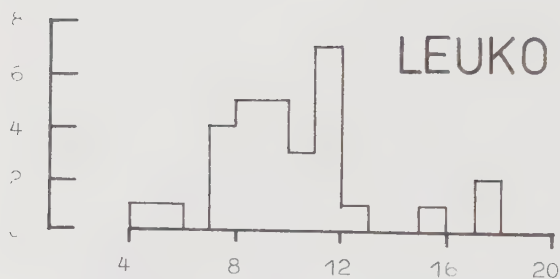
- bei den Leukozyten, segmentkernigen Granulozyten und Lymphozyten in Tausend,
- bei den eosinophilen und stabkernigen Granulozyten sowie bei den Monozyten in Hundert.

Die neben jedem Kollektiv am rechten Bildrand angegebenen Zahlen bedeuten von oben nach unten:

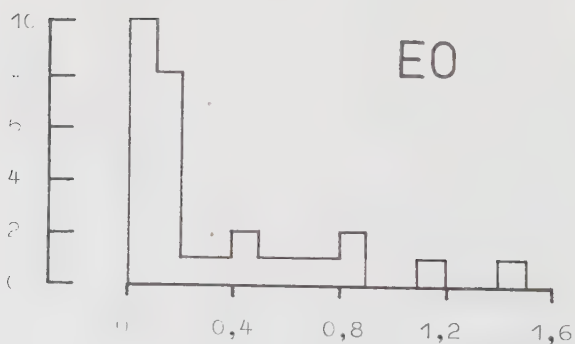
Anzahl der Tiere des Kollektivs	z.B.	18
Mittelwert		7 300
Standardabweichung des Mittelwertes		327
Standardabweichung		1 389
Variationskoeffizient		19

C1

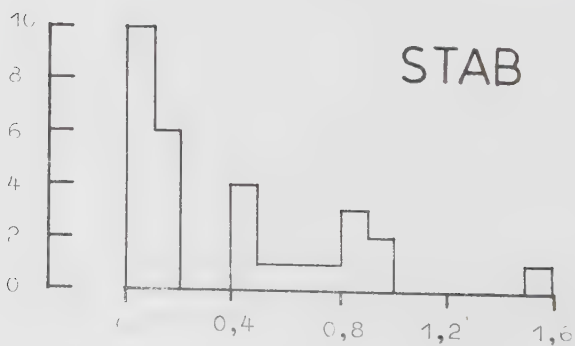
UNBEHANDELTE



30
10 073
501
; 073
51



29
23
7
20
173



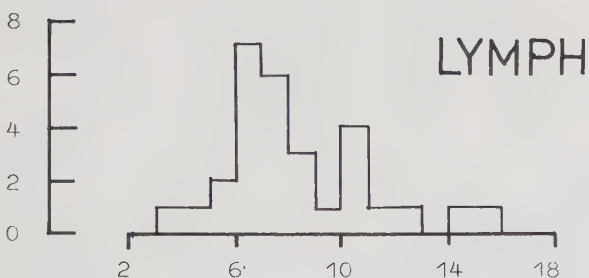
29
40
5
51
218

C 1

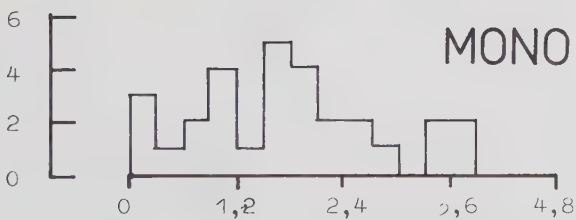
UNBEHANDELTE



29
1 652
1 5
15,24
50



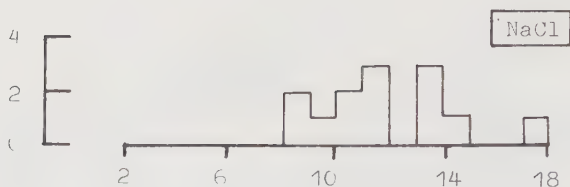
29
8 190
512
2 758
34



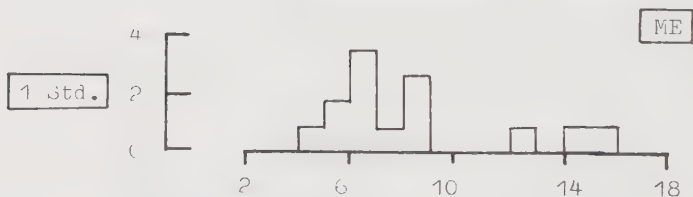
29
150
22
110
78

C 2

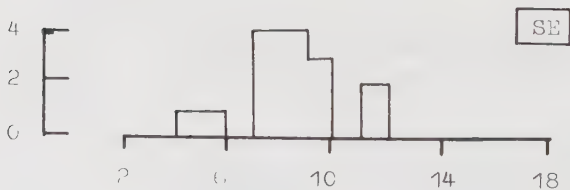
LEUKOZYTEN



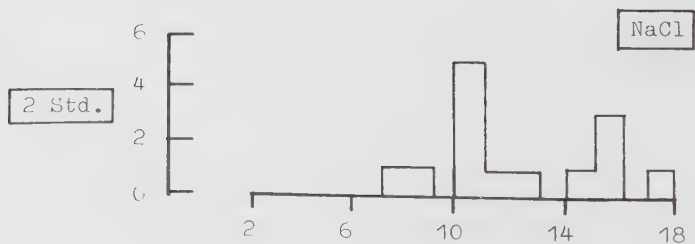
13
12 957
1 207
4 890
38



14
8 279
893
3 342
40



15
8 800
1 225
3 110
48

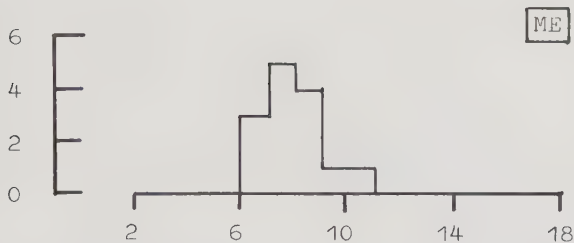


14
12 035
852
3 188
26

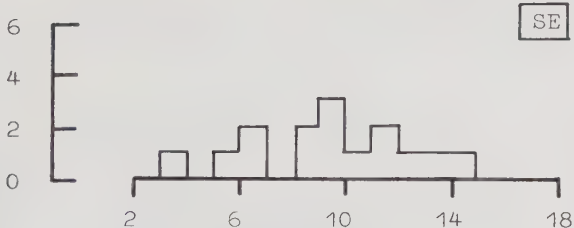
C 2

LEUKOZYTEN

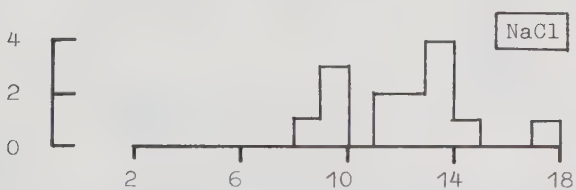
2 Std.



14
7 943
342
1 279
16

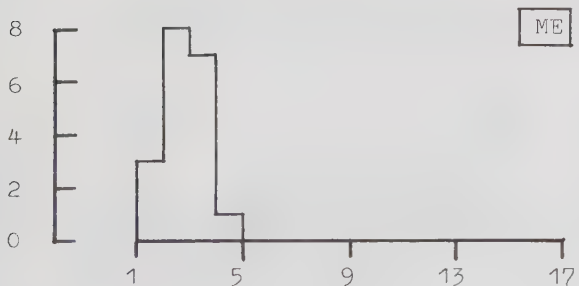


15
8 404
417
1 412
52



14
12 129
642
2 402
20

4 Std.



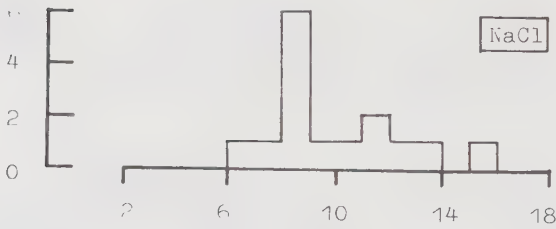
19
2 674
163
710
27

C2

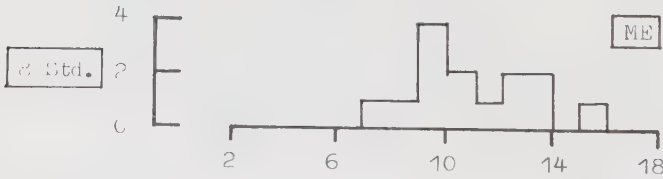
LEUKOZYTEN



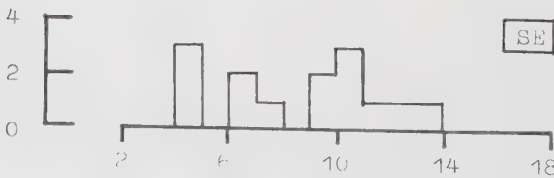
18
7 300
327
1 389
19



15
9 827
630
2 440
25



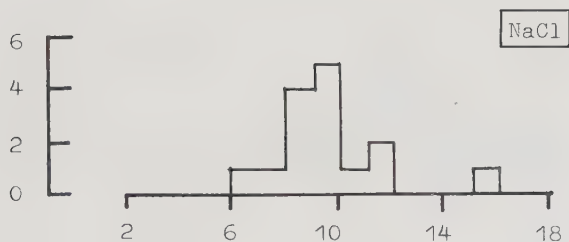
14
10 943
598
2 237
20



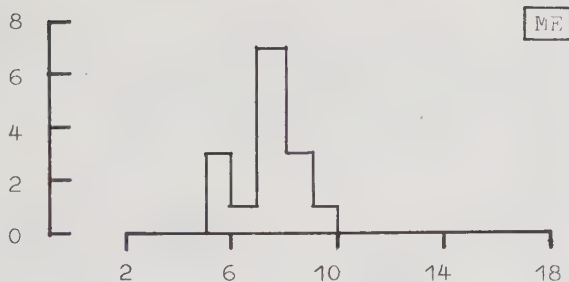
14
8 521
815
3 049
36

C2

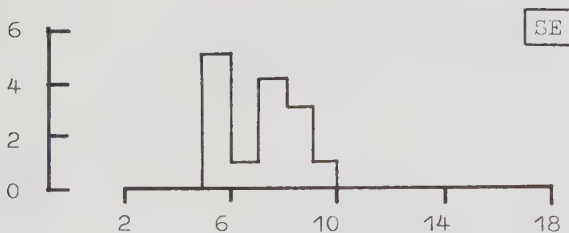
LEUKOZYTEN



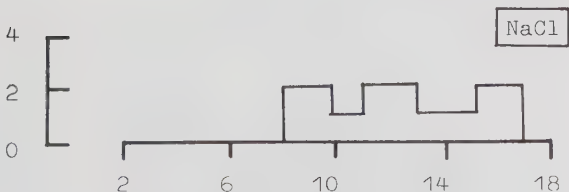
15
9 533
544
2 108
22



15
7 393
290
1 122
15



14
7 057
673
2 518
36



14
11 762
680
2 450
21

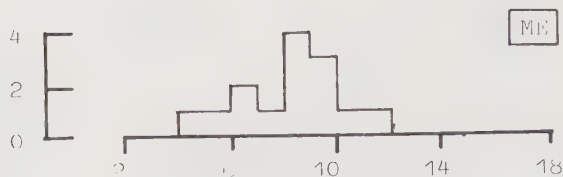
24 Std.

8 Std.

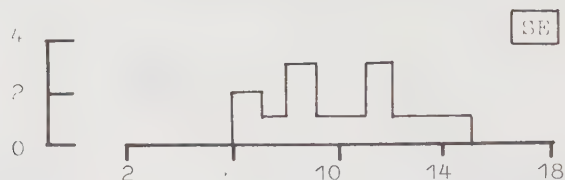
C 2

LEUKOZYTEN

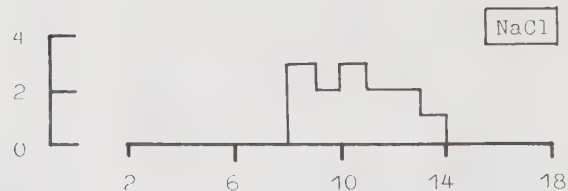
48 Std.



14
6 150
5 27
1 9/10
24

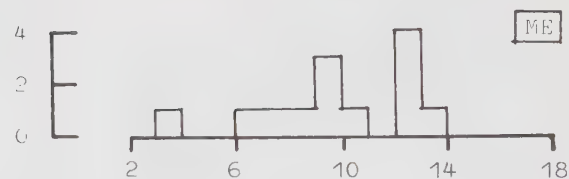


14
9 979
6 56
2 453
25

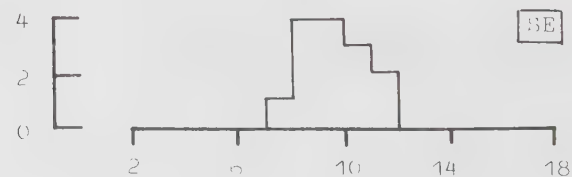


13
10 512
443
1 598
15

72 Std.



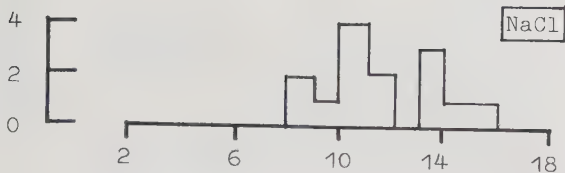
13
9 985
707
2 548
26



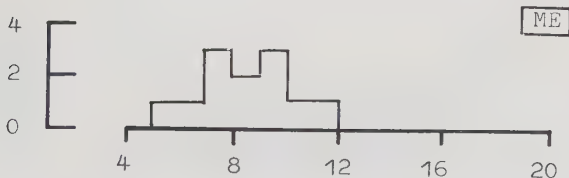
14
9 618
643
1 678
19

C 2

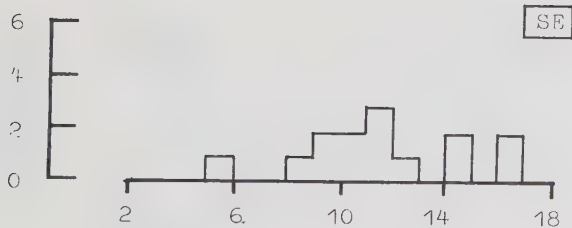
LEUKOZYTEN



14
11 536
575
2 151
19



12
8 408
526
1 822
22

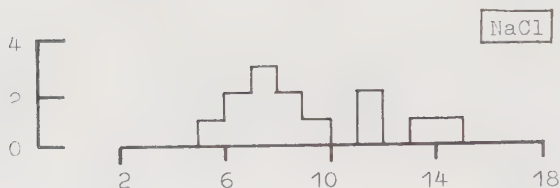


14
1 044
821
2 079
32

96 Std.

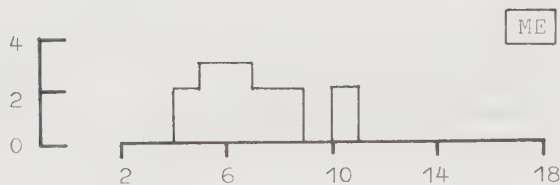
C 2

LYMPHOZYTEN

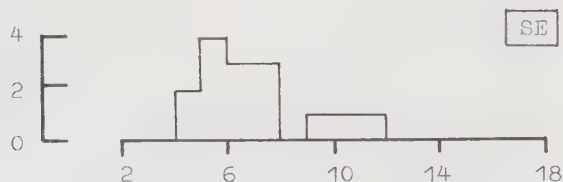


13
10 664
1 265
4 733
47

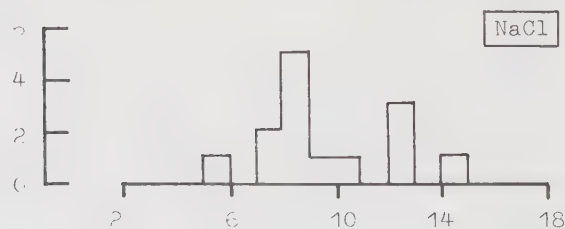
1 Std.



14
7 621
1 739
5 505
93

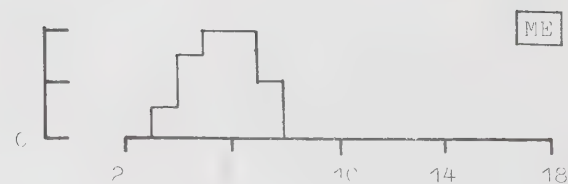


15
7 417
1 328
3 944
52



14
9 600
670
2 510
26

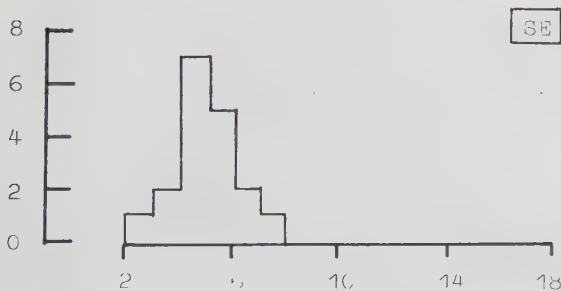
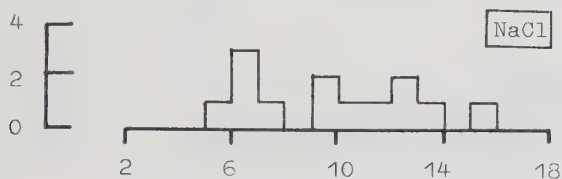
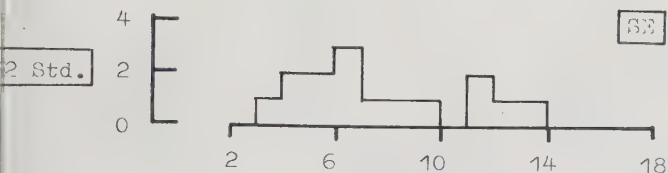
2 Std.



14
5 671
329
1 230
22

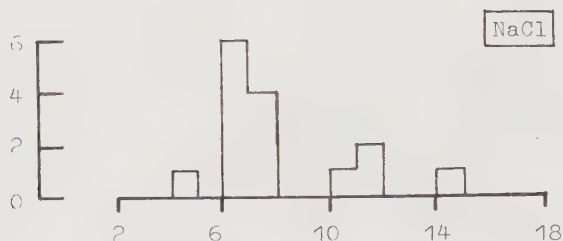
C 2

LYMPHOZYTEN



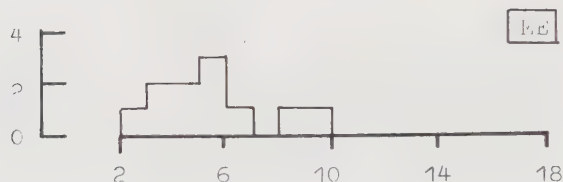
C 2

LYMPHOZYTEN

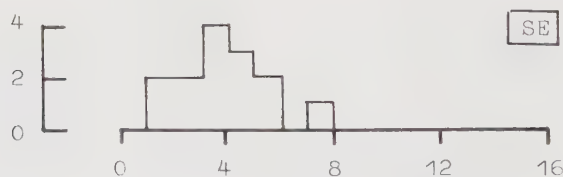


15
8 153
673
2 606
32

8 Std.

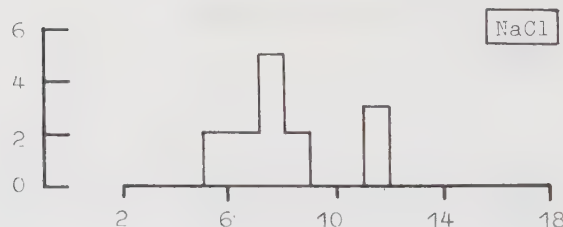


11
5 427
657
2 179
40

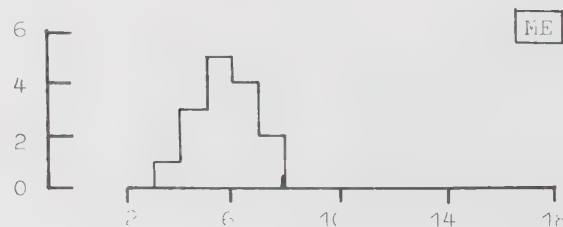


14
3 829
431
1 614
42

24 Std.



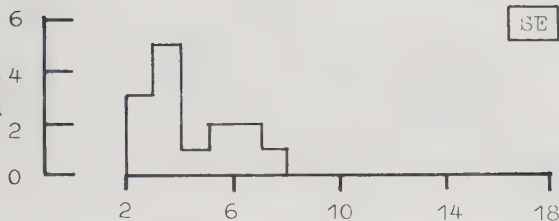
14
7 907
459
1 777
22



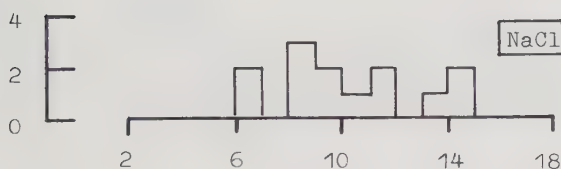
15
5 627
291
1 126
20

C 2

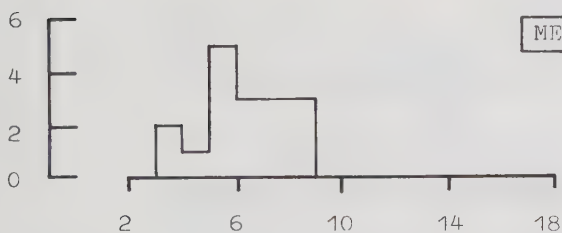
LYMPHOZYTEN



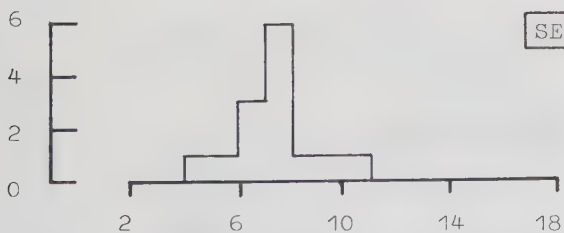
14
4 371
444
1 539
33



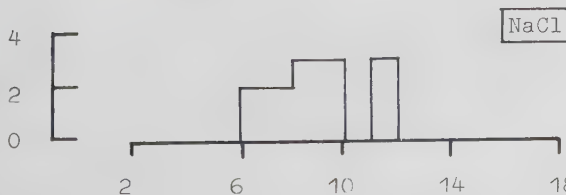
13
10 138
740
2 668
26



14
6 071
1 147
4 290
70



14
7 393
408
1 530
21

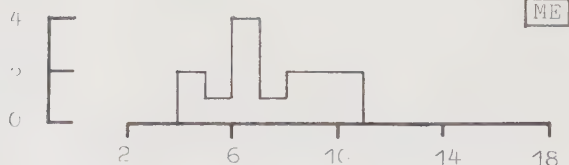


13
8 938
492
1 772
20

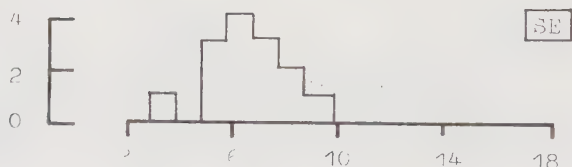
C 2

LYMPHOZYTEN

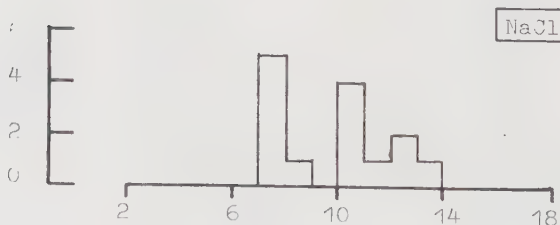
22 Std.



14
7 62
538
1 941
25

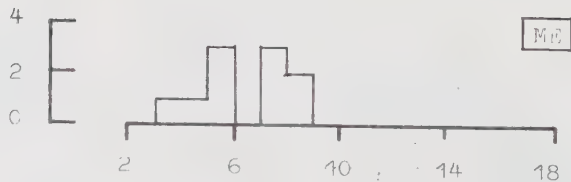


14
7 403
612
2 019
29



14
9 836
570
2 133
22

96 Std.



10
6 550
530
1 671
26



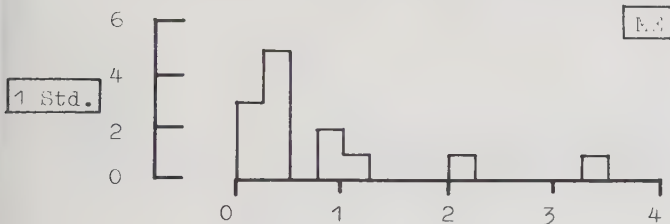
14
7 623
604
1 811
28

C 2

SEGMENTKERNIGE



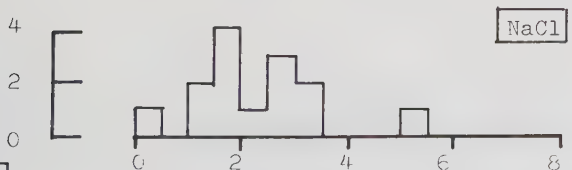
14
2 764
320
1 197
43



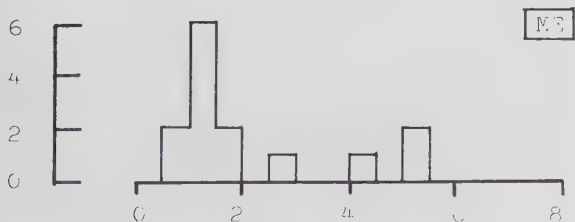
13
1 150
162
1 147
39



15
1 718
412
1 324
59



14
2 264
326
1 219
54

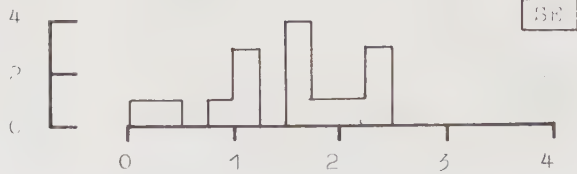


14
2 097
109
1 116
84

C 2

SEGMENTKERNIGE

2 Std.

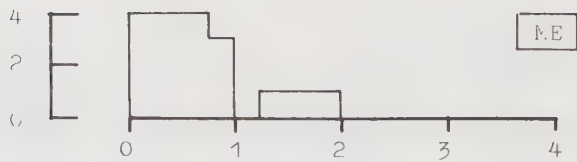


15
1 720
508
1 411
48



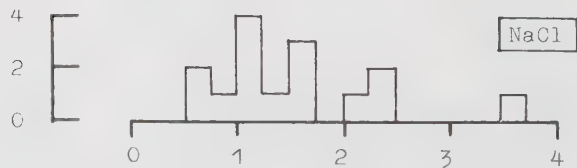
13
2 123
398
1 434
68

4 Std.



19
368
58
165
45

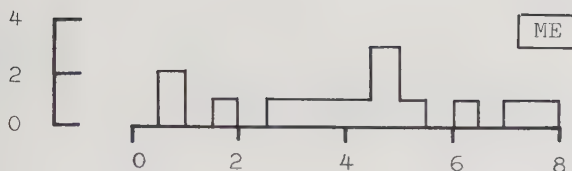
8 Std.



15
1 560
209
812
52

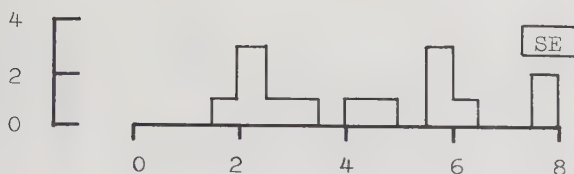
C 2

SEGMENTKERNIGE

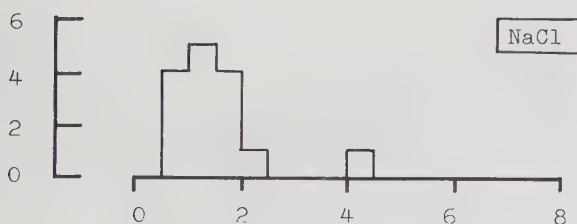


14
4 132
571
2 138
52

8 Std.

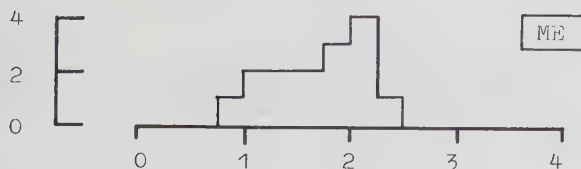


14
4 571
575
2 150
47

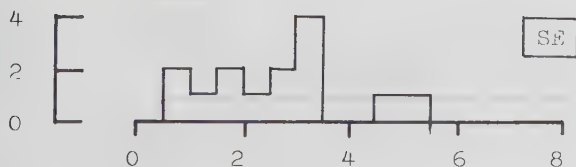


15
1 533
343
940
61

24 Std.



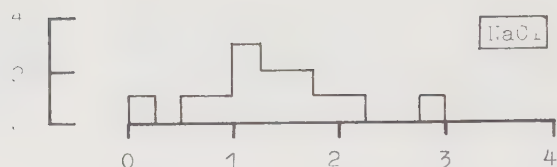
15
1 689
113
437
26



14
2 614
574
1 398
53

C2

SEGMENTKERNIGE



13
2
7
12
9



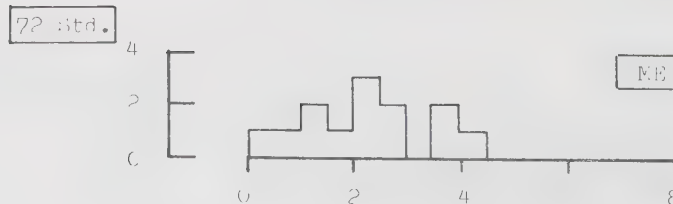
14
1 863
154
578
31



14
2 391
326
1 221
51



13
1 377
180
350
47

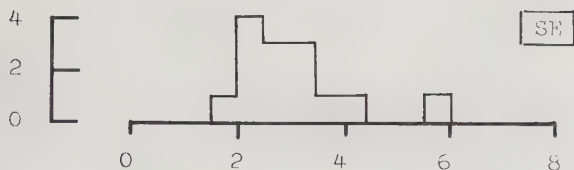


13
2 538
578
1 402
75

C 2

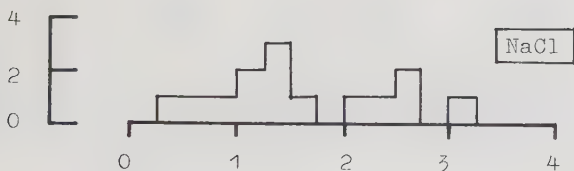
SEGMENTKERNIGE

72 Std.



SE

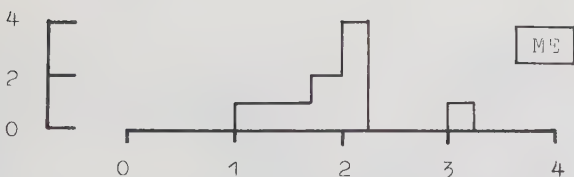
14
2 011
429
1 817
61



NaCl

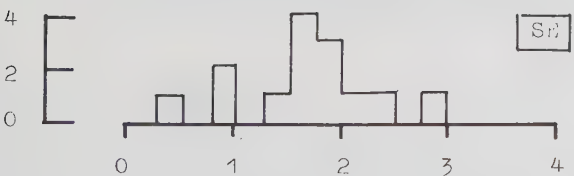
14
1 521
224
840
55

96 Std.



ME

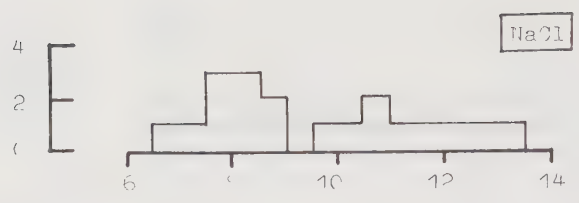
10
1 950
166
525
27



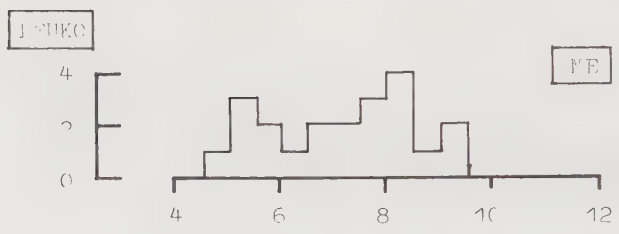
Sr

14
1 750
283
611
34

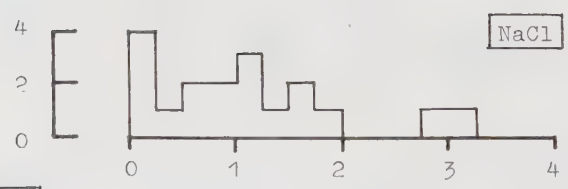
C 3.2



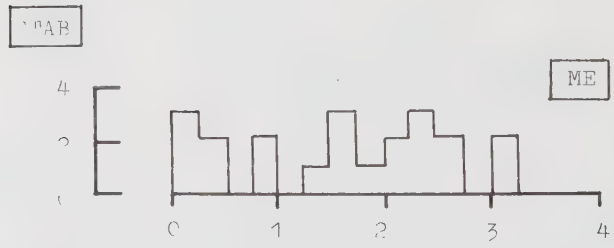
19
 9 580
 473
 2 062
 22



21
 7 119
 313
 1 437
 20

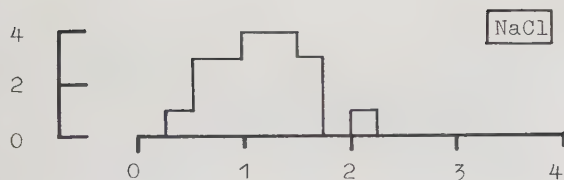


18
 98
 21
 88
 89



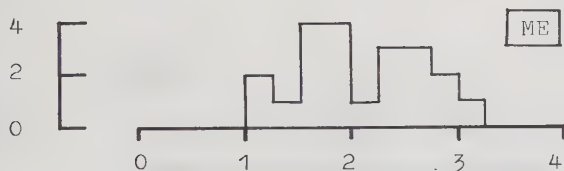
21
 150
 23
 107
 72

C 3.2

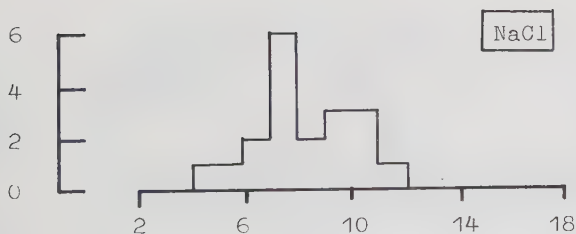


19
1 243
143
625
50

SEGM

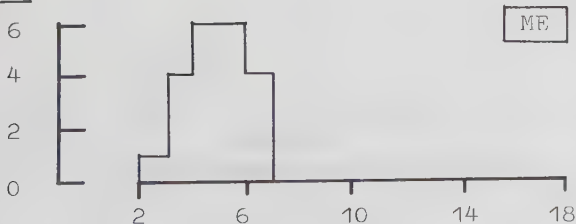


21
2 083
133
609
29



19
8 195
425
1 851
23

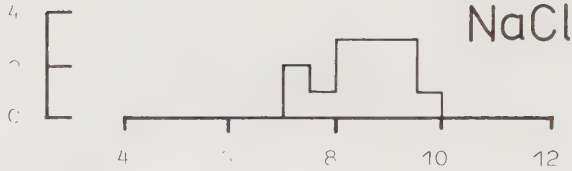
LYMPH



21
4 824
224
1 026
21

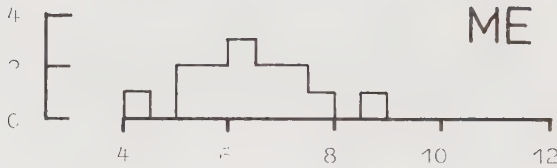
D1

LEUKOZYTEN

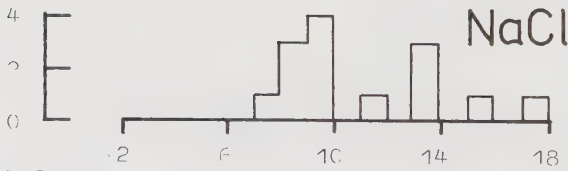


13
8 423
211
760
9

97 Std.

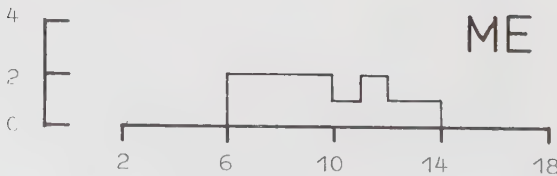


14
6 329
284
1 064
17



14
11 129
822
3 075
28

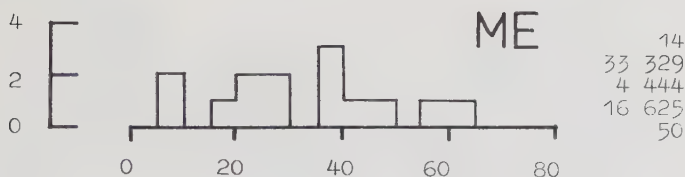
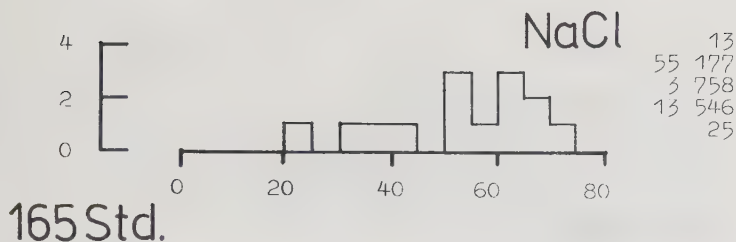
121 Std.



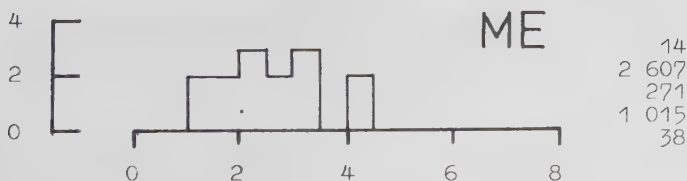
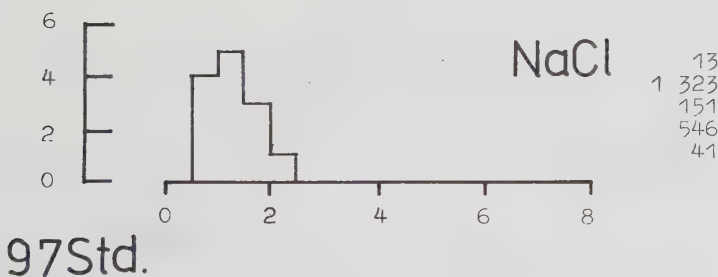
13
9 361
609
2 197
23

D1

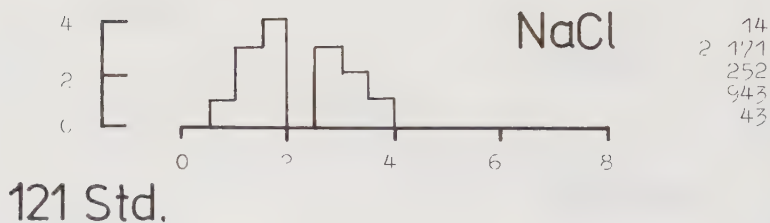
LEUKOZYTEN



SEGMENTKERNIGE



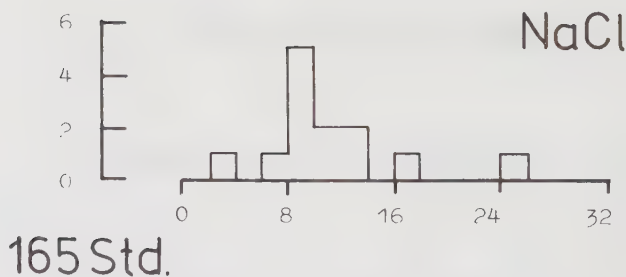
D1 SEGMENTKERNIGE



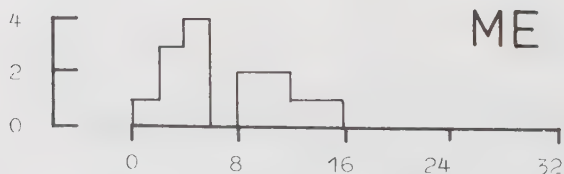
14
2 171
252
943
43



13
4 338
305
1 101
25



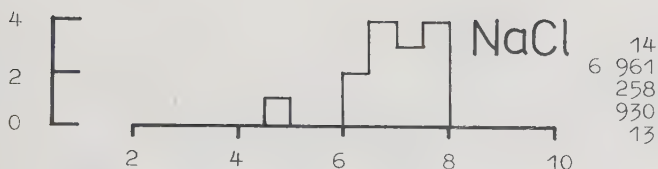
13
11 038
1 498
5 402
50



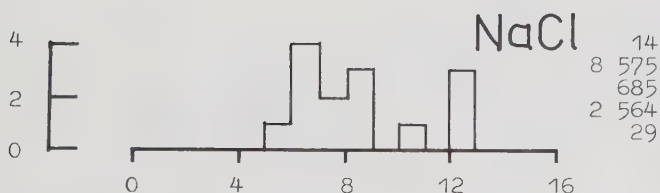
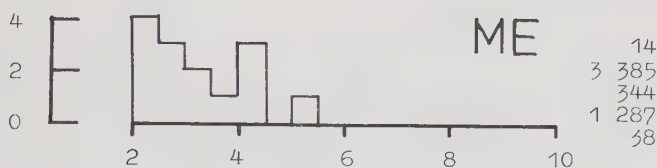
14
7 114
1 137
4 255
00

D1

LYMPHOZYTEN



97 Std.

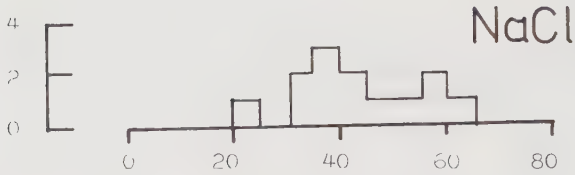


121 Std.



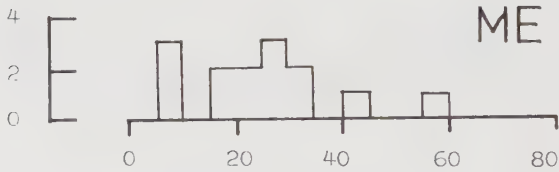
D1

LYMPHOZYTEN



13
42 865
3 142
11 529
26

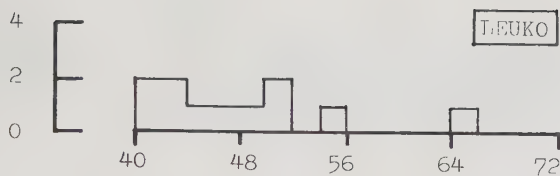
165 Std.



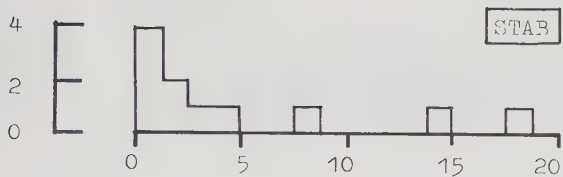
14
25 586
3 947
14 770
58

D 2

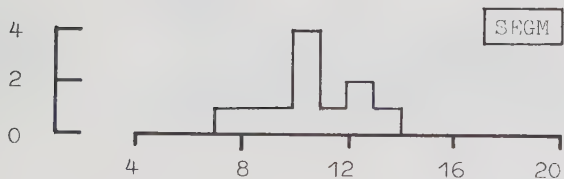
NaCl



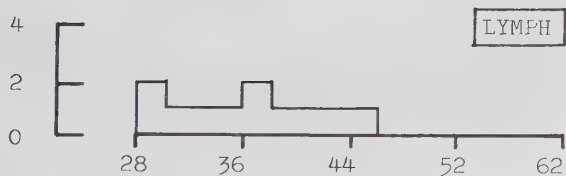
11
48 845
2 555
8 473
17



11
472
179
595
126



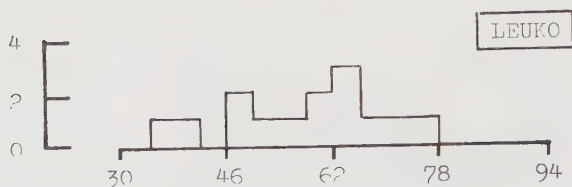
11
10 510
529
1 755
17



11
37 700
2 422
8 033
21

D 2

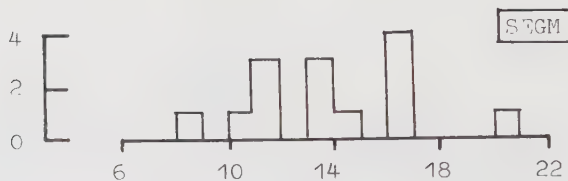
F 1



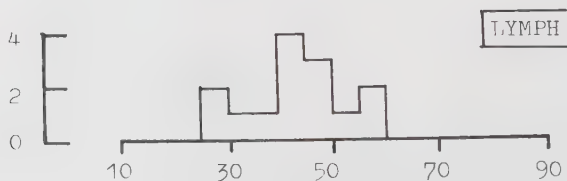
14
58 257
3 282
12 276
21



14
622
137
514
83



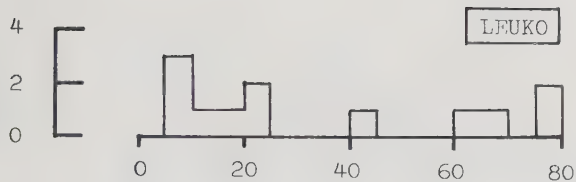
14
13 885
839
3 139
23



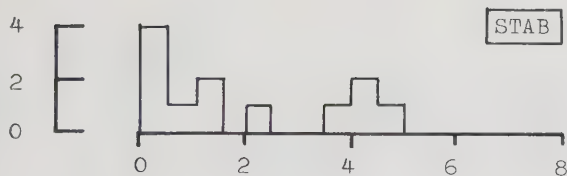
14
43 829
2 581
9 654
22

D 2

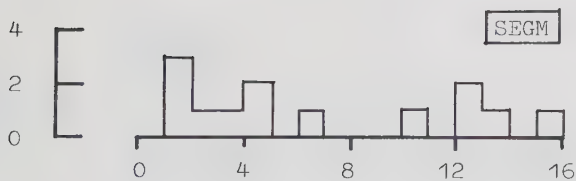
F 2



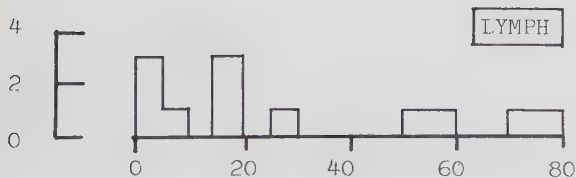
12
36 608
9 400
32 563
89



12
183
54
1 858
102



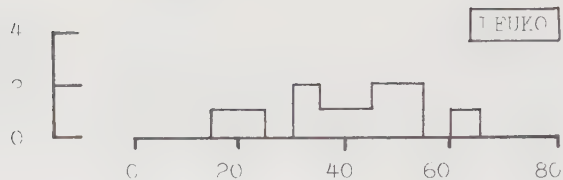
12
6 266
1 581
5 474
87



12
29 833
8 138
28 191
94

D 2

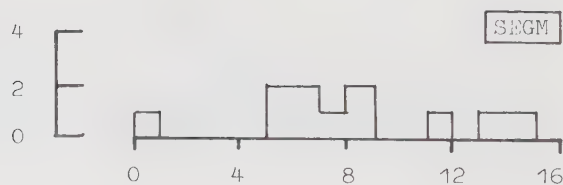
F 3



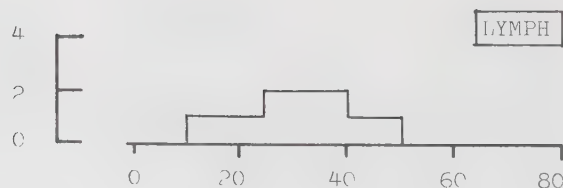
12
36 608
9 400
32 563
89



12
183
54
1 858
102



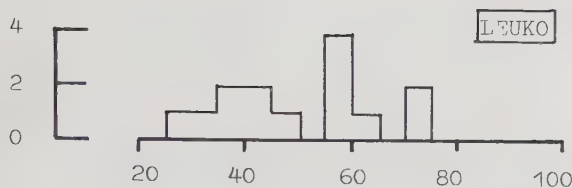
12
6 266
1 581
5 474
87



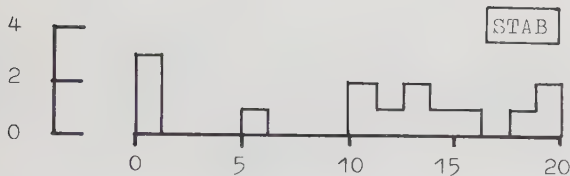
12
29 833
5 138
28 191
94

D 2

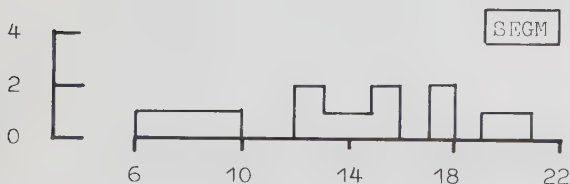
F 4



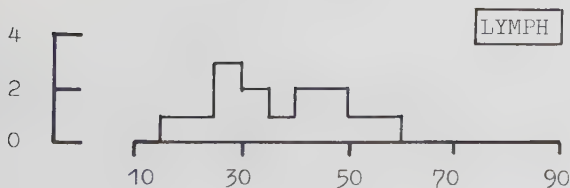
14
50 529
3 802
14 222
28



14
1 254
218
815
65



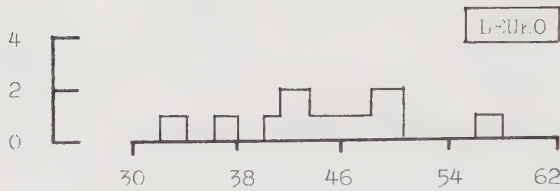
14
13 443
1 212
4 534
34



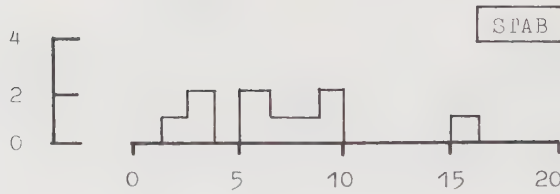
14
35 150
2 958
11 066
31

D 2

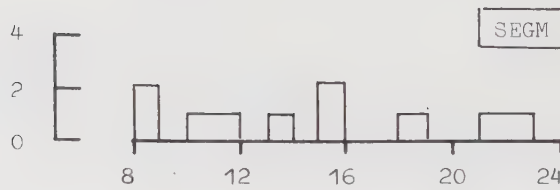
F5



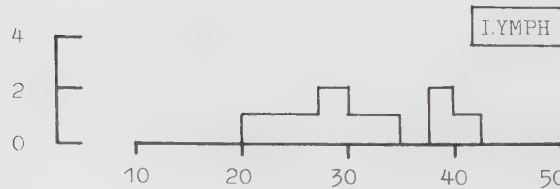
10
49 460
3 829
12 107
24



10
710
132
408
62



10
10 060
957
8 211
94



110
38 250
3 196
10 101
26

H L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1 AGARWAL, M.:

Role of spleen in endotoxin poisoning and reticuloendothelial function

Br.J.Exp.pathol. 53 (1972) 485

2 v. ALBERT, H.-H.:

Hemmwirkungen eines Extraktes aus einer menschlichen Hyperspleniemilz in der Knochenmarkkultur

Klin.Wschr. 40 (1962) 211

3 v. ALBERT, H.-H.:

Zur Frage einer depressorischen Knochenmarkwirkung "hypersplener" Milzen I. Experimentelle Untersuchung mit der Deckglaskulturmethode

Blut 9 (1963) 405

4 v. ALBERT, H.-H.:

Die Wirkung von eiweißfreien Milzextrakten auf die Tetrahydrofolat-Formylase in menschlichen Leukozyten

Klin.Wschr. 43 (1965) 751

5 v. ALBERT, H.-H. und H. ZICKGRAF:

Zur Frage einer depressorischen Knochenmarkwirkung "hypersplener" Milzen II. Experimentelle Untersuchungen an der Flüssigkeitskultur

Blut 12 (1966) 104

6 v. ALBERT, H.-H.:

Biochemische Untersuchungen über knochenmarkwirksame Faktoren in Milzextrakten

Zschr.Inn.Med. 24 (1969) 532

7 ALLEN, B.R., H.G. WARDELL and M. CLAY:

Postirradiation protection of rabbits by injection of "splenic" plasma

Science 123 (1965) 1080

- 8 ANDREWS, P.:
Estimation of the molekular weights of proteins by sephadex-gelfiltration
Biochem.Journ. 91 (1964) 222
- 9 ARAKI, F. and Y. SUGIHARA:
Carcinostatic substance prepared from bovine spleen
Hiroshima J. of Med.Sciences 18 (1969) 253
- 10 ASTALDI, G., R. AIRO, G. COSTA und N. DUORTE:
Milzbestrahlung und immunologische Antwort peripherer Lymphozyten von chron. lymphatischen Leukämien
Blut 13 (1966) 100
- 11 AUINGER, W., G. BRICHTA und A. NEUMAYR:
Über den Einfluß der Milz auf die Kapillarresistenz
Wien.Zschr. f. Inn.Med. 38 (1957) 96
- 12 BANTI, G.:
Titel fehlt
Arch. Scuola Anat.Pat. Firenze 2 (1883) 53
- 13 BEGEMANN, H. und W. GEHLE:
Die Auswirkungen der posttraumatischen Splenektomie
Dtsch.med.Wschr. 84 (1959) 449
- 14 BERENBLUM, I., G. CIVIDALLI, N. TRAININ and M.E. HODES:
Some properties of "RLP" - a factor from sheep spleen capable of inhibiting radiation leukemogenesis in mice
Blood 26 (1956) 8
- 15 BLACK, M.M., J.A. PRESTON and F.D. SPEER:
Histochemical and quantitative studies of the in vitro dehydrogenase activity of spleen in hypersplenism
Blood 10 (1955) 145

- 16 BLAUSTEIN, A.M.:
Normal and abnormal functions of the spleen
in: Blaustein, A.: The Spleen. Mc Graw-Hill
Book Company, Inc. 1967, p. 19 - 44
- 17 BOCK, H.E. und B. FRENZEL:
Splénomégale Knochenmark-Hemmung
Klin.Wschr. 17 (1938) 1315
- 18 BRENT, L. and P.J. KILSHAW:
Prolongation of skin allograft survival with
spleen extracts and antilymphocytic serum
Nature (London) 227 (1970) 898
- 19 BUDILLON, G.:
Titel fehlt
Arch.Biochem. 107 (1964) 264
- 20 BÜCHNER, Th., G. JUNGE-HÜLSING, H. WAGNER, W. OBER-
WITTLER, W.H. HAUSS:
Zur Herkunft und Entstehung von Entzündungszel-
len im Granulationsgewebe
Klin.Wschr. 48 (1970) 867
- 21 BURCKHARDT, R.:
Neue Ergebnisse über Funktionen und Erkrankun-
gen der Milz
Münchn.Med.Wschr. 102 (1960) 124
- 22 CHRISTENSEN, B.E., L.K. HANSEN, J.K. KRISTENSEN and
A. VIDEBAEK:
Splenectomy in haematology. Indications, results,
and complications in 41 cases
Scand.J.Haemat. 7 (1970) 247
- 23 COHRS, P., R. JAFFÉ, H. MEESEN:
Pathologie der Laboratoriumstiere
Springer-Verlag, Heidelberg 1958
- 24 COLE, L., M. ELLIS:
Spleen desoxyribonucleic acid content as an
index of recovery in X-radiated mice treated
with spleen homogenate
Cancer Research 14 (1954) 738

- 25 COTTIER, H.:
Experimenteller Beitrag zur Frage der hypersplenischen Panhämocytopenien
Acta Haematol. 7 (1952) 303
- 26 CROSBY, W.H.:
Is hypersplenism a dead issue?
Blood 20 (1962) 94
- 27 CROSBY, W.H. and F. RUIZ:
Evidence of a myeloinhibitory factor in the spleen
Blood 20 (1962) 793
- 28 CROSBY, W.H.:
Splenectomy in hematologic disorders
New Engl.J. of Med. 286 (1973) 1252
- 29 DAMESHEK, W. and S. ESTREN:
The spleen and hypersplenism
Grune a. Stratton, New York 1947
- 30 DALOS, B.:
Factor in serum inhibiting bone marrow mitoses after X-irradiation of the spleen
Nature (London) 205 (1966) 1252
- 31 DETERMANN, H.:
Gelchromatographie
Berlin 1967
- 32 DIETERICH, P., W. RINDT, E. KAISER:
Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen. VIII. Mitteilung: Der Einfluß von Milzwirkstoffen auf die Konjugation von Hydrocortison-4-C¹⁴
Acta hepato-splenol. 12 (1965) 293
- 33 DIETHELM, L. und W. LORENZ:
Hämatologische Studien an der röntgenbestrahlten Rattenmilz
Blut 10 (1964) 253

- 34 DONNELLY, N. and D.H. SUSSDORF:
Demonstration of simultaneous rosette and
plaque formation by splenic lymphocytes in
the rabbit
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 142 (Jan. 73) 351
- 35 DOUGHERTY, Th.F., J.A. FRANK:
The quantitative and qualitative responses
of blood lymphocytes to stress stimuli
J.Lab.Clin.Med. 42 (1953) 530
- 36 DOUGLASS, C.D. and L.P. DAY:
Effect of various doses of total body
X-irradiation on total amount of deoxy-
ribonuclease II in rat spleen
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 89 (1955) 616
- 37 EGER, W.:
Experimentelle Beiträge zur Wirkung von
Organextrakten als Leberschutzfaktoren
Münchn.med.Wschr. 98 (1956) 73
- 38 ELLINGER, F. and Th.A. STRIKE:
Effects of cell-free spleen extract treat-
ment on hematopoietic tissues of irradiated
Guinea-pigs
Acta Haematol. 26 (1961) 117, 325
- 39 McENDY, D.P., M.C. BOON and J. FURTH:
On the role of thymus, spleen and gonads
in the development of leukemia in a high-
leukemia stock of mice
Cancer Research 4 (1944) 377
- 40 ERNSTRÖM, U. and G. SANDBERG:
Influence of splenectomy on thymic release
of lymphocytes into the blood
Scand.J.Haemat. 7 (1970) 342
- 41 ESPOSITO, S.:
Effect on leukaemic cells of ribonucleic
acid extractes from calf's spleen
Nature (London) 203 (1964) 1078

- 42 ESSELTIER, A.F., L. MORANDI, R. STEIN:
Milz und Glucocorticoid-Eosinopenie
Dtsch.med.Wschr. 80,1 (1955) 84
- 43 MCFARLAND, W., N. GRANSVILLE, R. SCHWARTZ, H. OLINER,
D.K. MISRA and W. DAMASHEK:
Therapy of hypoplastic anemia with bone marrow
transplantation
Arch.int.Med. 108 (1961) 23
- 44 FERRATA, A. and A. FIESCHI:
Risultati e insegnamenti della splenectomia
nelle mielosi aplastiche
Haematologica 23 (1941) 979
- 45 FEY, F.:
Die Bedeutung der Milz in der Pathogenese
muriner virusinduzierter Leukämien
Z.ges.Inn.Med. 24 (1969) 511
- 46 FISCHER, I.:
Hypersplenismus. Was er ist, was er nicht ist
Internist 12 (1970) 176
- 47 FORD, L.C., D.M. DONALDSON and L. ALLEN:
Protection of mice by postirradiation treat-
ment with a cell-free component of spleen
Proc.Soc.Exp.Biol.Med 127 (1968) 286
- 48 FRANK, E.:
Aleukia splenica
Berl.Klin.Wschr. 53 (1916) 555
- 49 FRESSEN, O. und H. KRETSCHMER:
Beziehungen zwischen Milz und Hämopoese
Z.ges.exp.Med. 154 (1971) 36
- 50 GANONG, W.F.:
Medical Physiology
übers. v. W. Auerswald
Springer-Verlag, Berlin 1971

- 51 GORDON, A.S., E.S. HANDLER, C.D. SIEGEL, B.S.
DORNFEST, J. LOBNE:
Plasma factors influencing leukocyte release
in rats
Ann.N.Y., Acad.Sci. 113 (1964) 766
- 52 GORIZONTOV, P.:
Role of adrenaline and exclusion of alpha-
receptors in reactions of the hematopoietic
organs to stress
Bind.Eksp.Biol.Med. 73 (Dez. 72) 23
- 53 GOSLAR, H.G.:
Histologische und topochemische Untersuchun-
gen über das unterschiedliche Verhalten von
wässrigen Thymus-, Milz- und Lymphknoten-Ex-
trakten bei Reptilien
Endokrinologie 39 (1960) 283
- 54 GOSTOMZYK, J.G., C. FEESER und G. RUHENSTROTH-
BAUER:
Humorale Stimulierung der Ausschwemmung von
Granulozyten aus dem Knochenmark durch die
Milz
Klin.Wschr. 42 (1964) 231
- 55 GOSTOMZYK, J.G., C. FEESER und G. RUHENSTROTH-
BAUER:
Zur Chemie und Biologie des Milzfaktors Gra-
nulomovin
Zschr. f. Naturfshg. 19 b (1964) 769
- 56 GRESSER, J., M.Th. BANDU, M. TOVEY, G. BODO,
K. PAUCKER and W. STEWART:
Interferon and cell division.VII: Inhibitory
effect of highly purified interferon prepara-
tions on the multiplication of leukemia
L 1210 cells
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 142,1 (Jan. 73) 7
- 57 GROSS, R. und H.E. BOCK:
Erkrankungen der Leukopoese. Hypersplenismus
Klinik der Gegenwart 10 (1960) 589

- 58 GUTT, R.W.:
Zur Geschichte der Leukozytenkurve
Med.Klinik 67 (Nov. 72) 1495
- 59 HAAH, E. and A. AWNY:
The pathology of hypersplenism
Am.J.Clin.Pathol. 18 (1948) 313
- 60 HAGEN, U.:
Untersuchungen über die Entstehung der Thymus-
atrophie nach Röntgenbestrahlung. IV: Über die
Strahlenaktivierung von Fermenten
Habilitationsschrift Freiburg 1961
- 61 HAJOS, K., L. NEMETH, Z. ENYEDY:
Titel fehlt
Zschr.Exper.Med. 48 (1926) 590
- 62 HALPERT, B. and F. GYÖRKEY:
Lesions observed in accessory spleens of 311
patients
Am.J.Clin.Pathol. 32 (1959) 165
- 63 HAMILTON, P.K., H.S. HUTCHINSON, P.W. JAMISON and
H.L. JONES:
The pathology and pathogenesis of the hepato-
splenic disease assoziated with schistosomiasis
Am.J.Clin.Pathol. 32 (1959) 18
- 64 HARLOW, C.M. and H. SELYE:
The blood picture in the alarm reaction
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 36 (1937) 141
- 65 HARRIS, P.F., V. MENKIN and J.M. YOFFEY:
The action of leukocytosis-promoting factor on
the blood and bone marrow of the Guinea-pig
Blood 11 (1956) 243
- 66 HAUSS, W.H., G. SCHMITT, U.St. MÜLLER, P. TILLMANN:
Über die gleichförmige Reaktion des hämopoeti-
schen Systems auf heterogene Reize
Med.Welt 22 (1971) 627

- 67 HAVEMANN, K.:
Nucleinsäure- und Proteinsynthese in Lymphozyten-
kulturen von Gesunden und Patienten mit chron.
lymphat. Leukämie und Lymphogranulomatose
Verh.dtsch.Ges.Inn.Med. 74 (1968) 1261
- 68 HEILMEYER, L.:
Funktionsprüfung der Leukopoese des Knochenmarks
Handbuch d. ges. Hämatologie II, 2,2,S. 332,
Urban u. Schwarzenberg, München 1960
- 69 HEILMEYER, L.:
Physiologische Beziehungen zwischen Milz und
Knochenmark
Klin.Wschr. 29 (1955) 689
- 70 HELLMANN, W.:
Role of spleen in production of virus induced
interferon in rabbits
Arch.Ges.Virusfschg. 39 (1972) 396
- 71 v. HERRATH, E.:
Vergleichend-quantitative Untersuchungen an
8 verschiedenen Säugermilzen
Zschr.mikr.anat.Fschg. 37 (1935) 389
- 72 HIRSCHFELD, H.:
Die Erkrankungen der Milz
Springer-Verlag, Berlin 1920
- 73 HITTMAIR, A.:
Milzsymposion Innsbruck
Bibl.haem. 3, Basel-New York 1955
- 74 HITTMAIR, A.:
Physiologie und Pathologie der Milz
Urban u. Schwarzenberg, München 1969
- 75 JAEGER, K.-H. und H. MITTENZWEI:
Die Erzeugung einer Splenomegalie bei Kälbern
Klin.Wschr. 36 (1958) 441

- 76 KAISER, E., W. RINDT, W. ZIMMERMANN:
Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen,
I. Mitteilung: Hypophysen-NNR-Funktionskreis
unter dem Einfluß eines Milzextraktes
Acta hepato-splenol. 11 (1964) 321
- 77 KAISER, E. und W. RINDT:
Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen,
II. Mitteilung: Plasma-Corticosteroidbestim-
mung beim Meerschweinchen nach Applikation
eines selbst hergestellten Milzextraktes
Klin.Wschr. 42 (1964) 646
- 78 KAISER, E. und W. RINDT:
Milz und Endokrinium
Med.Klinik 60 (1965) 985
- 79 KELLER, H.M.:
Knochenmarksfunktion bei Lebererkrankungen
und Splenomegalien untersucht mit unspezifischem Reizstoff
5. Kongr. d. Europ. Ges. f. Hämatologie,
Freiburg 1955 (Springer 1956)
- 80 McKENZIE, J.:
Interferon-like activity of extracts of human spleen
Canad.Med.Assoz.J. 93 (1965) 204
- 81 KISSMEYER-NIELSEN, F.:
Experimentally produced hypersplenism
Proc. III. Congr.Intern.Soc.Hematol. New York
1951, 102
- 82 KNOSPE, W.H., W. FRIED, S. GREGORY, R. SASSETTI
and F. TROBAUGH:
Effect of a noncellular spleen-derived factor
on recovery of hematopoietic stem cells from
irradiation
J.Lab.Clin.Med. 76 (1970) 584
- 83 KOMIYA, E.:
Zellverschiebungen der Leukozyten. Leukozytose und Leukopenie
Handbuch . ges. Hämatologie II, 2,1, S. 309
Urban u. Schwarzenberg, München 1962

- 84 KUNZ, G.:
Die "depressorische Hypersplenie" - ein noch
gerechtfertigter Begriff?
Med. Welt 29,1 (1960) 913
- 85 LADNER, H.A.:
Zur Bedeutung der Milz beim Strahlenschaden.
5. Mitteilung: Überlebensrate und Serumpro-
teine nach Ganzkörperbestrahlung und Splen-
ektomie beim Hund
Strahlentherapie 132 (1967) 51
- 86 LAUDA, E.:
Das Problem der Milzhämolyse
Erg.Inn.Med. 34 (1928) 1
- 87 LAUDA, E.:
Diskussionsbeitrag in Sitzungsberichte der
Ges. f. Inn. Med. Wien
Zschr.Inn.Med. 37 (1956) 300
- 88 LI, J.G.:
The leukocytopenic effect of focal splenic
X-irradiation in leukemic patients
Radiology 80 (1963) 471
- 89 LINKE, A. und Th. SCHRICKER:
Die Bedeutung der Leber und Milz für die
neuro-humorale Regulation der Leukozyten
5.Kongr. d. Europ.Ges.f.Hämatologie,
Freiburg 1955 (Springer 1956)
- 90 LIPSON, R.L., E.D. BAYRD and Ch.H. WATKINS:
The postsplenectomy blood picture
Am.J.Clin.Pathol. 32 (1959) 526
- 91 LOZZIO, C.B. and B.B. LOZZIO:
Cytotoxic effect of a splenic factor on
human myeloid leukemic cellines
XIV. Int. Congr. of Hematol., Sao Paolo 1972
- 92 MAURICE, P.A. et A. JEAURENAND:
Dépression de l'erythropoièse par irradiation
exclusive de la rate
Schweiz.med.Wschr. 93 (1963) 1492

- 93 MENKIN, V.:
Mechanism of leukocytosis with inflammation
Arch.Path. 30 (1940) 363
- 94 MEYTHALER, F. und D. SÖLLA:
Die Indikation zur Splenektomie
Ärztl. Forschg. 14 (1960) 1
- 95 MOESCHLIN, S.:
Die Leukozytenkurve nach Pyriker als Knochenmarkfunktionsprüfung
Helvet.med.acta 12 (1945) 229
- 96 NEUMAYR, W.:
Über die Wirkung eines eiweißarmen Milz- und Serumextraktes aus Röntgen-Milzbestrahlten Ratten auf das weiße Blutbild von Mäusen
Diss. München 1972
- 97 NOLTENIUS, H.:
Die Milz - Zentralorgan des RES
Mat.med.Nordmark 23 (1971) 57
- 98 PALMER, J.G., E. EICHWALD, G.E. CARTWRIGHT
and M.M. WINTROBE:
The experimental production of splenomegaly, anaemia and leukopenia in Albino rats
Blood 8 (1953) 72
- 99 PEDERSEN, E.:
Studies on manifestations of transmitted mouse leukemia
Kopenhagen 1955
- 100 PEREZ-TAMAYO, R.:
Humoral factor(s) in experimental hypersplenism
Blood 15 (1960) 1145
- 101 PETERSEN, D.:
Biochemical changes in spleens of rats after localized X-irradiation
Proc.Soc.Exp.Biol. 88 (1955) 394

102 PHARMACIA FINE CHEMICALS:

Sephadex - Gelfiltration in Theorie und Praxis (1969)

103 PÖTTGEN, W.:

Die moderne Theorie des Hypersplenismus
auf der Grundlage zellkinetischer Befunde
Münchn. Med. Wschr. 97 (1972) 1100

104 POGGLITSCH, H.:

Splenektomie bei chron. idiopathischer
Thrombozytopenie
Med. Klinik 67 (Nov.72) 949

105 REIMANN, F., G. ERDOGAN und I. ULUGAY:

Untersuchungen über die Genese der Hyper-
splenie bei portalem Hochdruck
Acta hepato-splenol. 7 (1960) 230

106 REIN, H.:

Die Beeinflussung von Coronar- oder
Hypoxiebedingten Myokard-Insuffizienzen
durch Milz und Leber
Pflügers Archiv 253 (1951) 435

107 RIGLER, R. und W. ROSENKRANZ:

Untersuchungen über einen humoral ver-
mittelten, steuernden Einfluß der Milz
auf mesenchymale Zellteilungsvorgänge,
nachgewiesen am Deziduom der Ratte
Wien. Klin.Wschr. 69,1 (1957) 445

108 RINDFLEISCH, G.:

Wirkungen von Kälber-Milzextrakten auf
das weiße Blutbild der Maus
Diss. München 1972

109 RINDT, W., E. KAISER und W. ZIMMERMANN:

Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen.
III. Mitteilung: Harn- und Plasmasteroide
nach Splenektomie im Tierversuch
Acta hepato-splenol. 12 (1965) 98

- 110 RINDT, W., E. KAISER und W. ZIMMERMANN:
Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen.
IV. Mitteilung: Wirkung von Splenektomie
auf Plasmasteroide und Blutbild des Meer-
schweinchens unter dem Einfluß eines pyro-
genen Reizstoffes
Endokrinologie 47 (1964) 3
- 111 ROLOVIC, Z. and M. BALDINI:
Megakaryocytopoiesis in splenectomized
and "hypersplenic" rats
Brit. J. Haemat. 18 (1970) 257
- 112 ROSENKRANZ, W.:
Tierexperimentelle Untersuchung der Bezie-
hung zwischen Milz und weißem Blutbild
Proc. 7th Congr. Europ. Soc. Haemat.
Wien 1961, p.49
- 113 RUHENSTROTH-BAUER, G. and W. SCHIEBEL:
Characterization of a subzellular haemo-
lysing system from rat spleen
XIV. Congr. of Hematol., Sao Paolo 1972
- 114 SACHS, L.:
Statistische Auswertungsmethoden
Springer, Heidelberg 1972
- 115 SAVITSKY, J.Ph.:
Control of radiation hemorrhage with
splenic extracts
Blood 10 (1955) 52
- 116 SCHILLING, V.:
Die Regulierung des morphologischen
Blutbildes
Proc. 5th Congr. Europ. Soc. Haemat.
Freiburg 1955, p.196
- 117 SCHMIDT, M. and W. STICH:
The effect of a water-soluble fraction
(mol.w. 700-500) of calf serum on peri-
pheral blood status of healthy adults
XIV. Congr. of Hematol., Sao Paolo 1972

- 118 SCHLIEPHAKE, E.:
Inkretorisches System und Krankheitsent-
stehung
Dtsch.med.Wschr. 76 (1951) 1325
- 119 SCHOEN, D. und R. BAUER:
Ergebnisse mit der Milzbestrahlung bei
175 Fällen mit chronischer myeloischer
Leukämie
Strahlentherapie 135 (1968) 1
- 120 SCHÜRENBERG, W.:
Über die Wirkung niedermolekularer
Peptidfaktoren von Kälbermilz und Käl-
berserum auf das periphere Blutbild von
NMRI - Mäusen
Diss. München 1972
- 121 SELYE, H.:
Stressreaction
Nature (London) 138 (1936) 32
- 122 SIEGENTHALER, W.:
Klinische Pathophysiologie
Thieme, Stuttgart 1970
- 123 SKALKA, M. and J. MATYASOVA:
Post-irradiation changes in the des-
oxyribonucleoprotein complex in animal
tissues as revealed by the action of
heparin
Nature (London) 212 (1966) 1253
- 124 SPEIRS, R.S. and M.E. DREISBACH:
Quantitative studies of the cellular
responses to antigen injections in
normal mice
Blood 11 (1956) 44
- 125 STEVENS, A.R.:
Splenectomy in sickle cells anemia
Arch. intern. Med. 125 (1970) 883

- 126 STREICHER, H.J.:
Experimentelle Splenektomie in ihrer
Wirkung auf Erythrozyten - Regeneration,
Leukozyten - Regulation und Blutungs-
schock
Langenbeck's Arch.Klin.Chir. 293 (1960) 245
- 127 STREICHER, H.J.:
Was ist Hypersplenismus?
Langenbeck's Arch.Klin.Chir. 295 (1960) 378
- 128 STREICHER, H.J. und P.H. SCHMIDT:
Die Knochenmarksfunktionsprüfung unter
besonderer Berücksichtigung der Milzex-
stirpation
Klin.Wschr. 40 (1962) 667
- 129 STUTE, H.:
Splénomégalie and red blood cell destruc-
tion: a morphometric study on the human
spleen
Virchows Arch. 12 (1972) 1
- 130 SWINGLE, K.F. and L.J. COLE:
Radiation-induced free polydeoxyribonucleo-
tides in lymphoid tissues: a product of the
action of neutral desoxyribonuclease
Radiat. Res. 30 (1967) 81
- 131 TARNUZI, A. and R.K. SMILEY:
Hematologic effects of splenic implants
Blood 29 (1967) 373
- 132 TUNNERHOFF, F.K. und H.K. SCHWABE:
Tierexperimentelle Untersuchung über die
Möglichkeit, durch Milzextrakt die Ent-
wicklung von Granulationsgewebe zu beein-
flussen
Arzneimittelforschung 8 (1958) 773
- 133 TUNNERHOFF, F.K. und H.K. SCHWABE:
Tierexperimentelle Untersuchungen über den
Einfluß von Milzextrakt auf eine durch
Fibrin-Implantation angeregte Neubildung
des Bindegewebes
Arzneimittelforschung 9 (1959) 514

- 134 UNGAR, G.:
Endocrine function of the spleen and its
participation in the pituitary-adrenal
response to stress
Endocrinology 37 (1945) 329
- 135 WALDSCHMIDT, M.:
Das Verhalten von 1 - Aminosäureoxydase
und Acetyl-CoA-Dehydrogenase in den
Mitochondrien sowie der Gehalt an Flavin-
adenindinucleotid in Leber und Milz von
Ratten nach Bestrahlung in vivo
Strahlentherapie 132 (1967) 463
- 136 WEINREICH, I.:
Milz und Leber in ihrem Einfluß auf das
Blutbild - Untersuchungsergebnisse zum
Problem des "Hypersplenismus"
Acta hepato-splenol. 10 (1963) 81
- 137 WENNBERG, E. and L. WEISS:
Splenomegaly and hemolytic anaemia in-
duced in rats by methyl-cellulose - an
electronmicroscopic study
J. Morph. 122 (1967) 35
- 138 WESTPHAL, O., O. LÜDERITZ und W. KEIDERLING:
Über die Wirkungsweise bakterieller Reiz-
stoffe
Zentr.bl. f. Bakteriologie 158 (1952) 152
- 139 WETHERLEY-MEIN, G., N.F. JONES and J.M. PULLAN:
Effects of splenectomy on red-cell produc-
tion in myelofibrosis
Brit.Med.J. 1 (1961) 84
- 140 WHEELLOCK, E.F.:
Applied and induced interferon in the
prophylaxis and treatment of leukemia
Arch. intern. Med. 126,1 (1970) 64
- 141 WHITE, A. and Th.F. DOUGHERTY:
Effect of prolonged stimulation of the
adrenal cortex and of adrenalectomy on
the numbers of circulating erythrocytes
and lymphocytes
Endocrinology 36 (1945) 16

- 142 WISSENSCHAFTLICHE TABELLEN
DOCUMENTA GEIGY:
Geigy, Basel 1969
- 143 WOLF, H.J. und N. GERLICH:
Behandlung von Leukämien mit Milz-
extrakten
Verh.dt.Ges.Inn.Med. 61 (1955) 266
- 144 WOLF, H.J. und N. GERLICH:
Der Einfluß normaler Milzextrakte auf
das weiße Blutbild
Verh.dt.Ges.Inn.Med. 62 (1956) 530
- 145 WOLTERS, H.G. und M. BAUER:
Zur Frage einer humoralen Wirkung der
Milz auf die Regulation der Erythro-
zytopoese
Verh.dt.Ges.Inn.Med. 74 (1968) 619
- 146 ZILCH, M.J.:
Lymphsystem
München 1963
- 147 ZWICKER, M.:
Beitrag zum Einfluß der Splenektomie auf
Blutbild und Knochenmarkausstrich
Fol.haemat. (Leipzig) 74 (1956) 109
- 148 ZWICKER, M.:
Milzexstirpation bei hämolytischen und
splenopathischen Erkrankungen
Langenbeck's Arch.Klin.Chir. 295 (1960) 332

I L E B E N S L A U F

Am 1. 10. 1946 wurde ich als Sohn des Oberlehrers Martin Reithmeyr und seiner Frau Maria Reithmeyr, geb. Kammerbauer, in Göggingen/Schwaben geboren. Nach 4-jährigem Besuch der Volksschule besuchte ich das Humanistische Gymnasium bei St. Stephan in Augsburg, wo ich 1966 das Abitur ablegte.

Nach einem 2-semesterigen Studium der Musik am Augsburger Konservatorium und an der Freiburger Musikhochschule wechselte ich an die Münchner Universität und studierte 3 Semester Germanistik, Latein und Alte Geschichte.

Im Sommersemester 1969 begann ich an der Münchner Universität das Studium der Humanmedizin. Nach dem Physikum (Sommersemester 1971) wurde ich als Stipendiat in die Studienstiftung des Deutschen Volkes aufgenommen.

Im Dezember 1974 legte ich an der Münchner Universität die ärztliche Prüfung ab.

